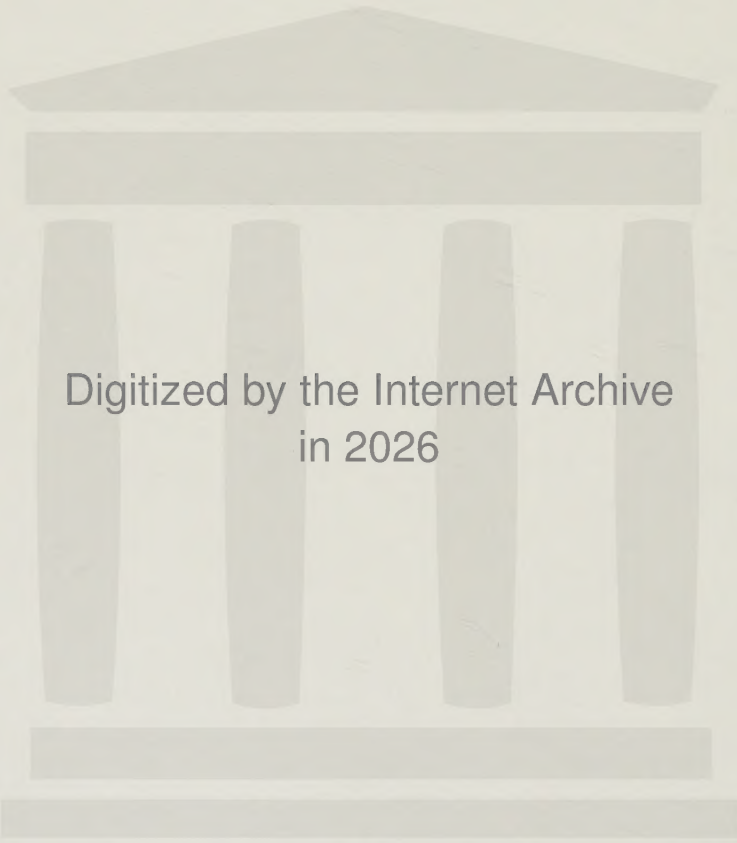


**NACHWEIS VON SPALTPRODUKTEN
VERSCHIEDENER IMMUNGLOBULINE
IN PURULENTEN SPUTEN**

Friedrich Burgert

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555615_0074

Aus der HNO-Universitäts-Klinik München

Direktor: Prof. Dr. med. H.H.Naumann

Biochem. Labor: Leiter Prof. Dr. rer.nat. K.Hochstraßer

NACHWEIS VON SPALTPRODUKTEN VERSCHIEDENER
IMMUNGLOBULINE IN PURULENTEN SPUTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Friedrich Burgert
aus Bad Tölz

München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München:

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. K. Hochstraßer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.1977



MEINER FRAU UND

MEINER TOCHTER GEWIDMET

Verwendete Abkürzungen

A-IgA, A-IgG ...	Antiserum gegen IgA, IgG ...
A-Fab	Antiserum gegen Fab-Fragment von IgG
A-Fc	" " Fc - " " "
A-IgG(H+L)	Antiserum gegen IgG, H- und L-Ketten
AK	Antikörper
alpha-1-AT	alpha-1-Antitrypsin
C'	Komplement
DID	Doppel-Immun-Diffusion
I.E.	Immunelektrophorese
Ig	Immunglobulin
MW	Molekulargewicht
RID	Radiale Immun-Diffusion
SchlH	Schleimhaut
SIgA bzw. S-IgA	sekretorisches IgA

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. THEORETISCHER TEIL	5
I. Immunologische Infektabwehr	5
II. Spezifische zelluläre Abwehr	5
III. Humorale spezifische Abwehr	6
1. Aufbau der Ig	6
2. Ig-Klassen	9
a) IgG	10
b) IgA	11
c) IgM	16
d) IgE	18
e) IgD	19
C. ERGEBNISSE	20
I. Ausgangsmaterial	20
1. Ergebnis der DID	20
2. Ergebnis der I.E.	21
II. Säulenchromatographie von Sputum	22
1. Fraktionierungskurve	22
2. Eichkurve zur Bestimmung des MW	22
3. MW in den Fraktionen	25
III. Nachweis von Ig und Ig-Fragmenten in den Fraktionen	26
1. Qualitativer Nachweis mit der DID	26
2. Quantitativer Nachweis mit der RID	28
a) Eichung der Platten	28
b) Absolute Konzentrationen für IgG in den Fraktionen	29

	Seite
c) Absolute Konzentrationen für IgA in den Fraktionen	31
3. Nachweis von Ig-Fragmenten mit der I.E.	34
4. Untersuchung auf verschiedene Antigendeterminanten	35
IV. Serum-Chromatographie	37
1. Fraktionierungskurve	37
2. Eichkurve zur Bestimmung des MW	37
3. MW in den Fraktionen	37
4. Auswertung mit der DID	40
V. Säulenchromatogr. von Sputum (II)	43
1. Fraktionierungskurve	43
2. Eichung der Säule	43
3. MW in den Fraktionen	43
VI. Nachweis von Ig und Ig-Fragmenten	46
1. Qualitative Bestimmung mit der DID	46
2. Quantitative Bestimmung mit der RID	48
a) Eichung der Platten	48
b) Konzentrationen für IgG in den Fraktionen	49
c) Konzentrationen für IgA in den Fraktionen	50
3. Test mit der Immunelektrophorese	52
4. Untersuchung auf verschiedene Antigen-Determinanten	54

	Seite
D. DISKUSSION	56
E. EXPERIMENTELLER TEIL	62
I. Versuchsübersicht	62
II. Materialien und Methoden	62
1. Probenauswahl	62
2. Aufbereitung der Proben	62
3. Säulenchromatogr. mit Sephadex G-200	63
a) Sputum-Fraktionierung	63
b) Prinzip der Säulenchromatographie	63
c) Reagentien und Geräte	63
d) Methodik	64
e) Eichung der Säule	64
f) Aufstellen der Eichkurve	64
4. Konzentrierung der fraktionierten Proteine	65
5. Zwei-dimensionale Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony	65
a) Prinzip	65
b) Reagentien und Geräte	66
c) Methodik	66
6. Einfache radiale Immundiffusion nach Mancini	67
a) Prinzip	67
b) Reagentien und Geräte	68
c) Methodik	68
d) Auswerten nach Erstellen einer Bezugskurve	68

	Seite
7. Immunelektrophorese	69
a) Prinzip	69
b) Geräte und Reagentien	69
c) Methodik	69
8. Nachweis verschiedener Antigen-Determinanten im Ouchterlony-Test	70
a) Prinzip	70
b) Reagentien und Geräte	71
c) Methodik	71
F. ZUSAMMENFASSUNG	72
G. LITERATUR	73
LEBENS LAUF	78

A. EINLEITUNG

Dem Organismus steht normalerweise zur Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts ein wirksames System von Regulations-Mechanismen zur Verfügung. Dieses Gleichgewicht wird von Gewebeschädigungen jeglicher Art gestört, worauf der Organismus bereits mit Abwehr-Funktionen antwortet.

Die erste Stufe dieser Abwehr stellt die lokale Entzündungsantwort dar, mit der der Bindegewebs-Gefäßapparat auf den gewebeschädigenden Reiz reagiert. Diese lokale Reaktion läuft immer nach dem gleichen Prinzip ab, über Hyperämie, Ödem, Leukozytenemigration und Reparation.

Die freiwerdenden Leukozyten sind Zellen mit phagozytierenden Eigenschaften und stellen einen wirksamen Schutz gegen eingedrungene Mikroorganismen dar. Im Entzündungsablauf kommt es offensichtlich zum Zerfall von Leukozyten und somit zur Freisetzung proteolytischer Enzyme aus diesen Phagozyten. Diese aus den lysosomalen Granula stammenden Proteasen spielen intrazellulär eine bedeutende Rolle im Zell-Metabolismus.

Die proteolytischen Enzyme der Leukozyten sind jedoch nur sinnvoll, solange sie in der intakten Zelle an die Verdauung der phagozytierten Substanzen gebunden sind.

Da einmal emigrierte Leukozyten nicht in das periphere Blut zurückkehren, sondern extravasal zerfallen, würden die dann freiwerdenden eiweißspaltenden Enzyme sich gegen körpereigenes Gewebe richten, wenn dieses nicht durch einen spezifischen Inhibitor geschützt wäre.

Man war lange Zeit der Meinung, diese Schutzfunktion würde von speziellen Antikörpern dargestellt, da man mit Serum diese proteolytischen Aktivitäten hemmen konnte.

Diese Ansicht erwies sich jedoch als falsch: Bei der Neutralisation der Proteasen handelt es sich nicht um Ig, sondern um einen Hemm-Mechanismus durch verschiedene spezifische Inhibitoren.

Dem Organismus stehen solche Hemm-Stoffe sowohl in Form von Serumproteinen wie alpha-1-Antitrypsin, alpha-1-Antichymotrypsin und alpha-2-Makroglobulin zur Verfügung, als auch eine Reihe lokal produzierter Inhibitoren.

HOCHSTRASSER und Mitarbeiter konnten in Nasen- und Bronchialsekreten verschiedene dieser spezifischen Inhibitoren charakterisieren (13,14,15). Sie stellten fest, daß der Schutz gegen proteolytischen Angriff entlang des gesamten zilientragenden Epithels des Respirationstraktes von niedermolekularen Inhibitoren gewährleistet wird.

Im Sputum von Patienten mit chronischer Bronchitis ist proteolytische Aktivität nachweisbar, die auf leukozytäre und bakterielle Proteasen zurückgeführt wird. Durch massiven Verbrauch an Inhibitoren durch Komplex-Bindung mit Proteasen kann es zu weitgehendem Ausfall des inhibitorischen Systems kommen. In diesen Fällen sind schlechte Heilungstendenzen zu beobachten, die häufig zu destruktiven Veränderungen führen, wie etwa zu Bronchiektasien; diese können entstehen, wenn die Hustenanfälle die geschädigten Bronchien unter erhöhten Druck setzen und damit die Lichtungen erweitern ohne daß sich diese Veränderungen wieder zurückbilden.

Jede dieser Veränderungen hat eine Störung des Flüssigkeits- und Sekret-Transports zur Folge. Die aufgestauten Schleimsubstanzen geben dort einen idealen Nährboden für Bakterien ab, sodaß es sekundär zu Entzündungen kommt.

Die Verlegung bzw. Einengung der Luftwege führt weiter zur Überdehnung der Lungenalveolen und zum Abbau der Alveolenwände (Lungenemphysem).

Ein Lungenemphysem kann sich jedoch auch ohne chronische Entzündung im Bronchialbereich entwickeln (primäres Lungenemphysem). Bereits 1963 beschrieben LAURELL und ERIKSON den Zusammenhang zwischen alpha-1-AT-Mangel und Lungenemphysem. Bei Patienten mit alpha-1-AT-Mangel entwickelt sich mit großer statistischer Wahrscheinlichkeit ein chronisch-obstruktives Lungenemphysem. Da das alpha-1-AT in den Lungenalveolen der vorherrschende polyvalente Inhibitor ist, wird ihm eine Schutzfunktion für das Lungengewebe gegen die Wirkung leukozytärer und bakterieller Proteasen zugeschrieben. Da auch der Lunge eine gewisse Leukozyten-Speicherfunktion zuzukommen scheint, könnte man hier einen erhöhten Leukozytenbefall erwarten, mit erhöhter Proteasen-Produktion. Ein Mißverhältnis

zwischen Hemmstoffgehalt und Anfall leukozytärer Proteasen wird als Ursache der pulmonalen Veränderungen bei alpha-1-AT-Mangel angesehen.

In diesen Fällen stellt sich eine Dyspnoe ein, die in der Regel einer chronischen Bronchitis vorausgeht. Diese wiederum ist verbunden mit verstärkter Schleimproduktion, verzögertem Sekret- und Schleim-Transport, sekundärer Keimbesiedelung, erneutem Proteasenanstieg.

Man erkennt, daß es sowohl bei hereditärem als auch bei erworbenem bzw. sekundärem Mangel an geeigneten Inhibitoren zu einer Obstruktion der Lunge kommt, worauf das Gewebe in jedem Falle mit einer chronischen Entzündung antwortet. Diese Form der Entzündung ist jedoch wieder mit Leukozytenemigration verbunden, die den bereits bestehenden Proteasenüberschuss noch weiter verstärkt: Es besteht ein *circulus vitiosus*.

Neben diesem inhibitorisch-immunologischen System existiert in den Bronchialsekreten jedoch zusätzlich das System der humoralen immunologischen Abwehr. Die Bedeutung dieses lokalen immunologischen Schutzapparates für die Respirations-Gewebe gegen eingedrungene Antigene liegt in ihrem Gehalt an Immunglobulinen. Obwohl mehrere Antikörper in den Bronchialsekreten gefunden wurden, ist eine der bekanntesten Ig-Klassen, das IgA, das vorherrschende Ig in Sekreten sowohl gesunder Individuen als auch von Patienten mit Erkrankungen des broncho-pulmonalen Systems (9).

Diese Ig sind ihrer chemischen Struktur nach aber Proteine, die auf proteolytischen Angriff empfindlich reagieren können (6,12,27). Die zelluläre Abwehr bedient sich dieser proteolytischen Funktion im Sinne einer Zerstörung eingedrungener Antigene und geht unspezifisch gegen körpereigenes als auch gegen artfremdes Eiweiß vor. Das oben beschriebene inhibitorische System ist der sinnvolle Schutz des Organismus gegen eine Selbstverdauung. Die Ig, die hauptsächlich zur Immobilisierung und zur Vorbereitung der Elimination eingedrungener Fremdkörper dienen, scheinen an diesem Schutz der Inhibitoren zu profitieren.

In den Fällen eines Proteasenüberschusses jedoch, wie oben

dargestellt etwa bei chronischen Bronchitiden und Obstruktionen sind diese Antikörper möglicherweise ebenfalls verändert. In 50 % der mukösen Sputen dieser Patienten sind denn auch Haemophilus influenzae und Pneumokokken enthalten, während beide Erreger in sterilem Tracheamaterial von Nichtbronchitikern nicht gefunden wurden. (29). Diesen Mikroorganismen wird eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der akuten Exazerbationen bei chronischen Bronchitiden zugeordnet (29).

Es stellt sich somit die Frage, ob das Auftreten dieser Erreger bei chronischen broncho-pulmonalen Affekten möglicherweise durch die von proteolytischer Aktivität veränderten Ig ermöglicht wird. Es ist denkbar, daß die Ig, die einen beträchtlichen Teil der Immunabwehr zu tragen haben, durch den Einfluß der im Entzündungsablauf entstehenden Proteasen soweit abgebaut oder gespalten werden, daß sie einen signifikanten Anteil ihrer natürlichen Abwehrfähigkeit gegen fremde Antigene einbüßen.

Die vorliegende Arbeit soll die Frage untersuchen, ob im Sputum von Patienten mit chronisch-obstruktiven broncho-pulmonalen Erkrankungen abgebaute bzw. gespaltene Ig vorliegen.

B. THEORETISCHER TEIL

I. Immunologische Infektabwehr

Im Laufe der Evolution haben die Vertebraten eine Reihe immunologischer Abwehrmechanismen entwickelt, mit denen sie das Eindringen und die Präsenz der für den Organismus potentiell schädigenden Substanzen verhindern können. Einmal bestehen unspezifische Abwehrmechanismen in Form von zellulärer unspezifischer Abwehr (Phagozytose durch Leukozyten und Retikulumzellen) und der humoralen unspezifischen Abwehr (z.B. Properdin, Komplement, Lysozym, Seruminhibitoren). Bei diesen Mechanismen wirken lediglich allgemeine Fremdkörpereigenschaften der abzuwehrenden Substanzen auslösend. Im Gegensatz dazu stehen die spezifischen Abwehrmechanismen: Bei diesen besteht eine genau definierte chemische Zuordnung, wodurch die Abwehrleistung speziell auf typische chemische Eigenschaften des fremden Antigens gerichtet ist. Auch hier ist zwischen einer zellulären und einer humoralen spezifischen Abwehr zu unterscheiden.

II. Spezifische zelluläre Abwehr

Die zelluläre spezifische Abwehr ist an Leistungen der immunologisch kompetenten Zellen, den kleinen Lymphozyten, gebunden. Diese bestimmte Population der kleinen Lymphozyten bildet sich in einer frühen Lebensperiode mit Hilfe des Thymus (T-Zellen).

Auch bei der zellulären Immunität spielen Antikörper eine Rolle: Sie sind an der Oberfläche der T-Zellen fixiert und dienen als spezifische Rezeptoren bei der Einleitung der zellulären Immunreaktion. Durch Antigenkontakt werden diese reaktiven Lymphozyten zur Ausschüttung von humoralen Faktoren aktiviert, welche nun Makrophagen zur Phagozytose stimulieren und dadurch die eigentliche zelluläre Resistenz ausmachen.

III. Humorale spezifische Abwehr

Die Mediatoren der humoralen spezifischen Immunität sind die Antikörper. Sämtliche im Organismus frei vorkommenden Antikörper haben ihren Ursprung in den sogen. B-Lymphozyten. Diese immunologisch aktiven Zellen scheinen dem Knochenmark zu entstammen; sie entwickeln sich zu Plasmazellen, die als eigentliche antikörperbildende Zellen angesehen werden. Die Antikörper werden von diesen ins Blut abgegeben und bedingen so die humorale Immunreaktion.

Immunglobuline (Ig) nennt man den heterogenen Anteil der Serumproteine, der die spezifischen Antikörper enthält. Ig werden gebildet als spezifische Immunantwort auf Antigene bzw. Immunogene. Die Immunantwort ist insofern spezifisch, als sie nur auf das auslösende Antigen bzw. eine diesem Antigen fast identische Substanz gerichtet ist.

1. Aufbau der Ig

Ig werden nach dem derzeitigen Stand der Forschung in fünf Klassen unterteilt: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Sie alle haben jedoch einen gemeinsamen Bauplan (Abb. 1):

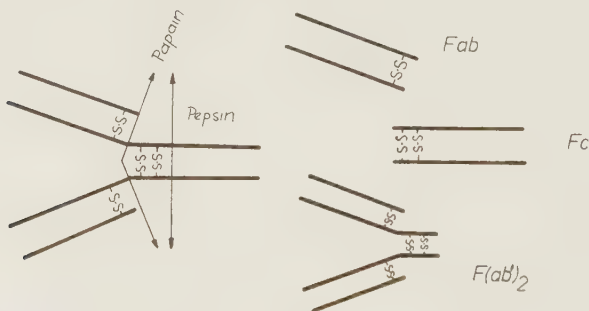


Abb. 1 - Gemeinsamer Bauplan aller Ig, schematisch. Die Pfeile zeigen die Spaltorte für Papain und Pepsin. Drei der hieraus entstehenden definierten Fragmente sind rechts angegeben.

Ig sind in Y-Form aus zwei symmetrischen Hälften aufgebaut und bestehen aus Paaren von identischen Polypeptidketten, den langen (schweren) und den kürzeren (leichten) Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

Die H-Ketten (Heavy-chains) bestehen aus ca. 450 Aminosäuren und bestimmen die Klasse der Ig. Ihre Variabilität in den biochemischen und antigenen Strukturen bildet die Basis für die Klassifizierung der Ig in fünf Hauptklassen, in vier IgG- und zwei IgA- Subklassen.

Die L-Ketten (Light-chains) bestehen aus 214 Aminosäuren und sind allen Ig-Klassen gemeinsam. Die beiden bekannten Typen werden als kappa- und lambda- Typ bezeichnet.

Sequenzanalysen reiner Ig zeigten, daß der C-terminale Anteil der Polypeptidketten weitgehend konstant, der N-terminale dagegen variabel ist. Dieses gemeinsame Strukturmerkmal aller am Aufbau der Ig beteiligten Polypeptidketten gilt für sämtliche H- und L- Ketten.

Das variable Stück auf dem N-terminalen Teil umfasst ca. 107 - 115 Aminosäuren. Es kann sich chemischen Eigenschaften der Antigene (den Antigen determinanten) genau anpassen und dadurch die Antikörperspezifität vermitteln.

Der konstante Teil am C-terminalen Ende der Kette umfasst auf der L-chain ca. 107 - 110 Aminosäuren, auf der H-chain ca. 310 - 330 Aminosäuren (24). Diese Sequenz ist mitbestimmend für die Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Struktur des gesamten Moleküls und beeinflusst dadurch weitere Eigenschaften des Antikörpers wie C'-Fixation und Reaktion mit Zellmembranrezeptoren.

Trotz der erstaunlichen Vielfalt der Ig ist es gelungen, einige Gesetzmäßigkeiten zu finden, die für alle Ig gelten (24):

Die Polypeptidketten lassen sich in "domains" oder homologe Regionen unterteilen, die ca. 110 Aminosäuren umfassen und jeweils durch eine intramolekulare Disulfidbrücke zu einer Schlinge verknüpft sind (Abb. 2).

Die N-terminale homologe Region (V_H oder V_L) stellt somit den variablen Teil der Kette dar. Auf der H-Kette entspricht die erste homologe Region des konstanten Teils, C_H1 , dem

konstanten Teil des Fd-Fragments. Die C_H2 entspricht der N-terminalen Hälfte von Fc. Die dritte homologe Region, C_H3 , besteht aus dem Rest der H-Kette bis zum C-terminalen Ende.

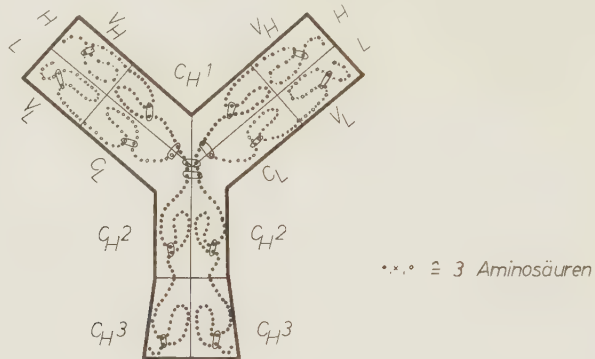


Abb. 2 - Struktur eines IgG-Moleküls. (nach: Chemie in unserer Zeit, Band 3, Seite 3, Verlag Chemie, Weinheim).

Bereits vor der Darstellung der Kettenstruktur der Ig war bekannt, daß sich Ig mit proteolytischen Enzymen wie Papain oder Pepsin aufgrund der für jedes Enzym spezifischen Spaltorte in reproduzierbare Fragmente zerlegen lassen, welche auch weiterhin einen Teil der biologischen Eigenschaften des Ausgangsmoleküls besitzen. Seit den grundlegenden Arbeiten von PORTER (27) über die Struktur der Ig haben sich die Bezeichnungen Fab, Fc, $F(ab')_2$ u.a. für definierte Bereiche des Ig-Moleküls durchgesetzt (Abb. 1).

Diesen Fragmenten der Ig lassen sich mit großer Genauigkeit die homologen Regionen zuordnen. So besteht der Fab-Bereich ($ab \hat{=}$ "antigen binding" site) aus der L-Kette und den V_H1 - und C_H1 -Regionen und trägt eine der beiden Antigen-Bindungsstellen des intakten Ig am N-Terminal. Das Fc-Fragment ($c \hat{=}$ "complement binding" site) setzt sich aus den restlichen "kompakten Zonen", der C_H2 und der C_H3 zusammen, wobei beide H-Ketten-Reste, abhängig von ihrer Klassen- bzw. Subklassenzugehörigkeit, nur durch nicht-kovalente Kräfte zusammenge-

halten sein können (24).

Obwohl die Bindungsstelle für Antigene am Fab sitzt, ist doch der Anteil der Antikörper an vielen biologischen Reaktionen abhängig von der Integrität des Fc-Teils. Beispielsweise ist die Wechselwirkung mit C' abhängig von der unbeschädigten C_H2-Region (24); die zytophile Aktivität, die Fähigkeit, die Plazenta zu überwinden und die Anaphylaxie scheinen den gesamten intakten Fc-Teil zu benötigen (30). Die biologischen Funktionen der Ig scheinen demnach direkte Konsequenzen ihrer dreidimensionalen Strukturen zu sein.

2. Ig-Klassen

Im menschlichen Serum sind bis heute fünf verschiedene Ig-Klassen bekannt, die sich hinsichtlich ihres Molekulargewichts, ihrer Konfiguration, ihrer biologischen Wirksamkeit, ihres quantitativen Vorkommens und ihrer Verteilung in den Geweben ganz erheblich unterscheiden. In Tabelle 1 sind einige wichtige Merkmale der Ig-Klassen dargestellt.

	IgG	IgA	IgM	IgE	IgD
MW	150000	160000 390000	900000	200000	150000
Konfig.	meist monomer	meist dimer	meist pentamer	monomer	monomer
biolog. Wirkung	Spät-AK protektiv	Sekret-Ig	Früh-AK	Reagine	?
Konz. (mg%)	800-1600	100-450	60-280	1-20	0,05-0,12
Gewebe- vertlg.	ubiquitär	SchlH	besond. im Blut	Haut u. SchlH	besond. intravas.

Tab. 1 - Eigenschaften der Ig-Klassen.

a) IgG

Das IgG stellt ca. 80 % der Serum-AK. IgG-produzierende Zellen werden überall da angetroffen, wo eine Ig-Synthese stattfindet. Ein Austausch von IgG zwischen Blut und extravasaler Flüssigkeit findet leicht statt, sodaß das IgG als ein ubiquitär vorkommendes Ig des Organismus angesehen werden kann. Humanes IgG enthält ein Gemisch aus vier verschiedenen IgG-Subklassen: Der Hauptanteil besteht zu ca. 70 % aus IgG1; weit geringer ist der Anteil an IgG2 mit ca. 18 %. Der Rest besteht zu ca. 8 % aus IgG3 und zu etwa 4% aus IgG4. Zwischen diesen Subklassen existieren jedoch signifikante Unterschiede in den dem Fc-Teil zugeordneten biologischen Aktivitäten. Tabelle 2 enthält die wesentlichen Unterscheidungsmerkmale der IgG-Subklassen.

IgG ist die einzige Ig-Klasse, die klar die Plazenta überwinden kann; dies ist auch die einzige bisher bekannte, gemeinsame Fähigkeit aller Subklassen von IgG. Zytotoxische Killerzellen (spezielle Lymphozyten) scheinen besonders von IgG2 und IgG4 aktiviert zu werden, während IgG3 die stärkste C'-Bindung zeigt (18).

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
C'-Fixation	xx	x	xxx	0
PCA-Reaktion	xxx	0	xxx	xxx
Reaktion mit Staph.-Protein A	xxx	xxx	0	xxx
Plazenta-Transfer	xxx	xxx	xxx	xxx
Aktivierung zytotox. Killer-Zellen	?	xxx	?	xxx

Tab. 2 - Biologische Eigenschaften der IgG-Subklassen.

Zusätzlich zu den divergierenden biologischen Bedeutungen besteht zwischen den Untergruppen des IgG eine unterschiedliche Enzymempfindlichkeit. Für beides sind wohl die strukturellen Unterschiede in der Verbindung der H-Ketten verantwortlich (7): IgG1 und IgG4 besitzen zwei Inter-H-Ketten-Disulfidbrücken, die IgG2 tragen vier und die IgG3 sogar fünf dieser S-S-Verbindungen.

Das IgG3 unterscheidet sich noch in mancher Hinsicht von den anderen Subklassen. So hat das IgG3 mit ca. 190000 ein höheres MW. Dieses resultiert aus den längeren H-Ketten dieser Moleküle, die ein MW von ca. 60000 aufweisen im Vergleich zu MW 50000 der anderen IgG-Moleküle. Der zusätzliche Teil der IgG3 H-Kette liegt in der "Hinge"-Region, wo die beiden H-Ketten durch die Disulfidbrücken verbunden sind (20). Die verlängerte Hinge-Region zwischen den homologen Regionen C_H1 und C_H2, die keine Homologie zeigt zu irgendeiner H- oder L-"domain" (1), erklärt vielleicht die große Anfälligkeit dieser Unterklasse gegen Proteolyse und den rapiden Katabolismus in vivo (16). Diese Phänomene sind eventuell auch mit der großen Zahl von S-S-Brücken in einem Zusammenhang zu sehen.

b) IgA

Das IgA ist dem IgG in verschiedener Hinsicht sehr ähnlich, sodaß es bis zur Gewinnung spezifischer Antisera von diesem nicht unterschieden werden konnte.

Human IgA besteht aus zwei antigenisch verschiedenen Subklassen IgA1 und IgA2, die sich in ihrer H-Kettenstruktur unterscheiden. Während das IgA1 die gleiche Polypeptidkettenstruktur aufweist wie die anderen Ig, zeigen die IgA2 einen genetischen Polymorphismus (36). In einer der beiden Formen des IgA2 (Typ A2m(1)) bestehen keine Disulfidbrücken, welche die H- und L-Ketten miteinander verbinden, sondern nur S-S-Verbindungen zwischen den beiden H-Ketten und den beiden L-Ketten. Der geringer vorkommende Allotyp A2m(2) besitzt jedoch das zur Verbindung von H- und L-Ketten notwendige alpha-Ketten-Peptid und zeigt die normale Kettenstruktur der anderen Ig.

IgA zeigt unter den Ig ein einzigartiges Bild der Molekulargewichts-Heterogenität: In normalem menschlichem Serum liegt das IgA hauptsächlich als 7S-Monomeres vor (85 %), die deutliche Tendenz zur Bildung höherpolymerer Moleküle ist jedoch klar erkennbar an der Existenz von 10S-, 13S- und 18S-Komplexen im Serum.

Die größte Bedeutung hat IgA jedoch nicht als zirkulierender Serum-AK, sondern als sogen. sekretorisches IgA in inneren und äußeren Körpersekreten. Dieses SIgA ist das dominierende Ig in den nicht vaskulären Flüssigkeiten wie Speichel, Nasen-Bronchialsekret und im Magen-Darm-Trakt (31).

Die Hauptkomponente dieser sekretorischen Ig hat einen Sedimentations-Koeffizienten von 11S und ein MW von ca. 390000. Das SIgA-Molekül besteht aus zwei 7S-IgA-Monomeren und zwei weiteren sowohl antigenisch als auch chemisch unterscheidbaren Glykoproteinen (Abb. 3).

Die länger bekannte Kette, die sogen. sekretorische Komponente (SC), ist verantwortlich für einige zusätzliche Antigen-Determinanten des SIgA gegenüber dem Serum-IgA. Das SC hat ein MW von ca. 60000 und besteht aus einer einzigen Polypeptidkette. Beim menschlichen SIgA-Molekül ist SC über Disulfidbrücken an die Fc-Teile der H-Ketten gebunden. Mit Ausnahme der nur in geringer Konzentration vorkommenden 7S-Monomere besitzen alle IgA in den verschiedenen externen Sekreten diese sekretorische Komponente. Ob das SC an beide 7S-IgA gebunden ist oder tatsächlich nur an eine der monomeren Untereinheiten vom 7S-IgA des menschlichen SIgA-Dimeren (33) ist nicht endgültig geklärt.

Zusätzlich zu den drei bekannten Polypeptidketten (H- und L-Ketten, SC) wurde noch eine vierte Kette im SIgA identifiziert. Die sogen. J-Kette (J $\hat{=}$ joining = verbindend) hat ein MW von ca. 20000; sie wurde auch festgestellt im polymeren IgA und IgM des Serums (hier jedoch nicht im IgG, IgE und IgD), im Speichel-IgA und im IgM-Makromolekül.

J-Ketten wurden außer beim Menschen auch bei anderen Spezies nachgewiesen; sie scheint demnach charakteristisch für polymere Ig zu sein. Quantitative Studien weisen darauf hin, daß jeweils eine J-Kette pro 11S-IgA-Dimer und ebenso eine pro

IgM-Pentamer vorhanden ist, die in jedem Falle jedoch identisch sind (23).

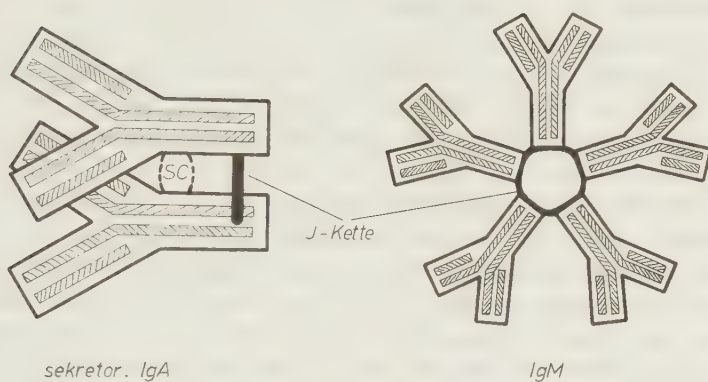


Abb. 3 - Schemazeichnung von sekretor. IgA und IgM.

Die Bindung der J-Kette an die α - bzw. μ - Ketten erfolgt immer am C-terminalen Ende der jeweiligen H-Ketten. Diese tragen im Anschluß an die C_H3 -Region ein 19 Aminosäuren langes Peptid, das die Verbindung von J-Kette und α - bzw. μ -Kette determiniert (19).

Die biologische Wertigkeit der J-Kette ist nicht völlig gesichert. Man kann jedoch annehmen, daß die J-Kette sowohl Katalysator als auch Kontrolle für die Polymerisation von SIgA und IgM-Makroglobulin darstellt. Die J-Kette mit ihrem hohem Gehalt an Cystein soll auch an der Erhaltung der Tertiärstruktur des polymeren Ig-Moleküls beteiligt sein (26).

Es ist heute bekannt, daß der größte Teil des SIgA lokal in Plasmazellen des Submukosabereiches eines sekretorischen Organs synthetisiert wird. In den Plasmazellen der sezernierenden Teile werden auf Antigenreiz zwei monomere 7S-IgA-

Moleküle mit einer der in der gleichen Zelle produzierten J-Kette zum 10S-IgA-Dimeren vereinigt. Möglicherweise stammen jene 15 % an polymerem IgA, die normalerweise im Serum feststellbar sind, aus diesen sekretorischen Zellen.

Daß die Masse dieser IgA-Dimeren jedoch nicht in die Blutbahn abwandert, sondern zum SIgA wird, liegt an seiner spezifischen Fähigkeit, sich mit dem in den Epithelzellen synthetisierten SC zu den fertigen 11S-IgA zu verbinden. Diese Schlussvereinigung findet nun statt in den Epithelzellen der Schleimhaut, worauf das komplette SIgA in das glanduläre Lumen sezerniert wird.

Es ist anzunehmen, daß die Bedeutung des SC darin liegt, den Transport von SIgA auf die Schleimhautoberfläche zu erleichtern und das Globulin auf seinem Weg durch das epitheliale Zytoplasma vor einer intrazellulären Verdauung zu bewahren. Zudem verleiht die starke Resistenz gegen Proteolyse in den Körpersekreten den SIgA-AK, ob nun durch SC oder durch eine Kombination von SC und J-Kette, einen klaren biologischen Vorsprung gegenüber den anderen AK, sodaß das SIgA als Schleimhautoberflächen-AK prädestiniert erscheint.

Es wurde eindeutig festgestellt, daß das SIgA eine neutralisierende Wirkung gegen Viren besitzt (3). Beispielsweise werden bei der oralen Polioschutzimpfung nach Sabin sekretorische AK mobilisiert. Da diese im Verlauf der Virus-Affektion sehr frühzeitig aktiv werden, wirken sie einer Initial-Replikation des Virus entgegen. Auf diese Weise ist es möglich, daß die SIgA eine Immunität aufbauen, indem sie die Besiedelung der Mukosa verhindern. Dieser Wirkungsmechanismus konnte deutlich gezeigt werden bei verschiedenen Myxoviren. Demgegenüber erscheint die protektive Wirkung der sekretorischen Ig gegen Bakterien nicht ganz geklärt. Antibakterielle AK-Aktivität wirkt entweder durch C'-Fixation oder durch Opsonierung, beides scheint nicht die bedeutende Rolle und bedeutende biologische Funktion von SIgA zu sein. Das SIgA besitzt wenig, wenn überhaupt irgendeine Opsonierungskapazität für polymorphkernige Leukozyten (35). Andererseits ließ sich für die normalerweise nicht C'-bindenden IgA-AK ein neuer Weg erkennen, auf dem C' in IgA-vermittelte anti-

bakterielle Reaktionen einbezogen ist (11). Diese modifizierte C'-Fixation, die über die sogen. "bypass"-Reaktion stattfindet, besitzt möglicherweise eine biologische Relevanz auch für das SIgA.

Auf den ersten Blick scheint diese fragliche antibakterielle C'-Aktivierung einen Mangel der SIgA zu bedeuten. Es scheint aber so zu sein, daß eine C'-vermittelte Abwehr von Mikroorganismen, die doch stets mit Entzündungsreaktionen verbunden wäre, für die Schleimhäute besonders schädlich sein würde. Der antibakterielle Wirkungsmechanismus scheint dennoch auch für SIgA in geringem Grad in einer Wechselwirkung mit Lysozym, einem unspezifischem, bakterizid wirkenden Abwehrstoff zu liegen. Diese "nicht-immunglobuline" Substanz kommt in den meisten exokrinen Körpersekreten vor und bildet mit großer Wahrscheinlichkeit mit den sekretorischen IgA-AK den wirksamen Schutz gegen lebende Antigene auf der Mukosa. Zusätzlich zu dieser protektiven Wirkung gegenüber Mikroorganismen spielt das SIgA eine dominierende Rolle gegen nichtlebende Antigene, die hauptsächlich durch die Nahrung bzw. durch die Atemluft aufgenommen werden. Das SIgA besitzt die Fähigkeit, Komplexe zu bilden mit nicht-spezifischen Proteinen, was zu intensiver Adhäsion und Haftung an der Schleimhautoberfläche führt. Bereits hier eliminiert SIgA Antigene in großer Zahl noch vor einer möglichen Resorption bzw. Diffusion in tiefere Bereiche der Mukosa. Dieser Schutzeffekt, dem die lokale Synthese des SIgA und dessen Transfer durch die Schleimhaut-Epithelien zugrunde liegen, können aufgefasst werden als eine "erste Verteidigungslinie" der Mukosa zur Abwehr der als fremd erkannter Antigene. Wird diese Barriere in ausreichender Menge durchbrochen und eine dauernde Reizung in tieferen Schichten hervorgerufen, so scheint eine "zweite Verteidigungslinie" tätig zu werden. Diese zweite Abwehrlinie ist verbunden mit einer lokalen IgG-Antwort und mit chronischer Entzündung (4). Obwohl sich diese sekundäre Abwehr primär positiv für den Organismus auswirkt, entstehen doch auf längere Sicht schädliche Folgen.

Um dieses lokale Immunsystem von den in die Blutbahn sezernierten Ig zu unterscheiden, wurde der Begriff "sekretorisches Immunsystem" für die Schleimhaut-AK eingeführt (31).

c) IgM

Das IgM besitzt eine ähnliche Grundstruktur wie die anderen Ig, kommt jedoch hauptsächlich als 19S-AK vor. In diesen Riesenglobulinen sind fünf monomere 7S-AK zu einem pentameren IgM-Komplex mit einem MW von ca. 900000 verknüpft. Die einzelnen Monomere sind über die Fc-Teile durch eine einzige J-chain untereinander verbunden (Abb.3). Diese J-Kette ist identisch mit der des SIgA-Moleküls (23) und auch hier maßgeblich beteiligt an der spezifischen Raumstruktur des pentameren IgM-AK, einem runden, nur wenig zylindrischem Areal, aus dem die fünf Fab-Bereiche wie Arme radial herausragen.

Die Ursache, weshalb beim Menschen das IgM fast immer als ein einheitliches Pentameres sezerniert wird, liegt in der balancierten Synthese von 7S-IgM und J-chain in den IgM-produzierenden Plasmazellen (26); im Gegensatz hierzu ist der Pool an J-Kette in den IgA-Zellen begrenzt, sodaß IgA in der bekannt großen Heterogenität auftreten kann.

IgM-AK sind in erster Linie Blut-AK. Aufgrund des hohen MW kann IgM ohne Vorliegen einer lokalen Entzündung und damit erhöhter Permeabilität der Kapillarwände nur bedingt aus den Blutgefäßen austreten.

AK vom IgM-Typ werden in der Frühphase der Immunantwort gebildet und treten nur kurze Zeit auf gegen lösliche Antigene; für eine längere Zeit können auch sie gebildet werden gegen partikuläre Antigene. Aus phylogenetischen und ontogenetischen Erkenntnissen kann angenommen werden, daß die IgM-Bildung im Vergleich zur IgG-Entstehung eine primitivere Form der Immunantwort darstellt. Möglicherweise wird durch diese "früher erlernte" Abwehrreaktion die Tatsache erklärbar, daß fast alle "natürlichen" AK (= AK, die ohne erkennbare Infektion bzw. Antigen-Zufuhr entstanden) gegen bakterielle oder zelluläre Antigene zu dieser Ig-Klasse gehören.

Die IgM-AK besitzen trotz ihrer 10 erwarteten häufig aber nur

fünf Antigenbindungsstellen. Die aber immer multivalenten IgM-AK scheinen speziell auf jene Antigene ausgerichtet zu sein, die auf ihrer Oberfläche ein sich wiederholendes Muster von nahe beieinander gelegenen, gleichen oder fast ähnlichen Antigen-Determinanten besitzen, wie beispielsweise Pneumokokken-Kapseln und O-Antigene gram-negativer Bakterien. Eine einzelne Antigenbindungsstelle zeigt nur eine geringe Avidität und erst die gemeinsame Wirkung mehrerer Bindungsstellen im Gesamtmolekül ergibt eine effiziente Bindekraft. Befindet sich ein Antigen also nicht in einem Zelloberflächenverband, sondern tritt als gewöhnliches Protein mit einer Anzahl verschiedener Antigen determinanten auf, so können nicht alle Bindungsstellen des IgM wirksam werden und die einzelnen aktiven Zentren dissoziieren leicht. Folglich sind zur Neutralisation von bakteriellen Toxinen und zum Zellschutz gegen Viren diese Makromoleküle nur von untergeordneter Bedeutung.

Die eigentliche biologische Funktion der IgM-AK liegt somit wohl in der Schutzwirkung gegen Mikroben. IgM hat wie das IgG die Fähigkeit zur Agglutination, zur C'-abhängigen Abtötung der Keime und auch klare Opsonierungs-Qualität. Es genügt bereits ein einziges IgM-AK-Molekül, um durch C'-Aktivität eine Lyse des Mikroorganismus herbeizuführen.

Diese Möglichkeit des IgM ist wohl in direktem Zusammenhang zu sehen mit der typischen Tertiärstruktur des Moleküls: Das flachzylindrische IgM-Makromolekül besitzt in idealer Weise die Voraussetzung zur C'-bedingten Lyse einer Zelle, nämlich die mindestens zwei sehr nahe beieinander auf der Zelloberfläche gelagerten monomeren Ig. Die IgG zeigen wohl ebenso die C'-vermittelte Abtötung von Keimen, doch die Wahrscheinlichkeit, daß sich wenigstens zwei der monomeren IgG-AK genügend nahe beieinander auf der Zelloberfläche anhaften, ist nur gegeben durch eine ca. 10^2 bis 10^3 mal höhere Zahl der IgG im Vergleich zu IgM (5). Unter diesem Aspekt erscheint die Tatsache, daß IgM die "Früh-AK" darstellen, plausibel. Dieser AK-Typ scheint die Zeit bis zur Produktion ausreichender Mengen IgG zu überbrücken, um dann den Hauptanteil der Abwehr den IgG-AK zu überlassen.

d) IgE

Das IgE ist erst in den letzten Jahren als eigene Ig-Klasse definiert worden. Viele Untersuchungen sprechen dafür, daß diese Ig-Klasse die "Reagine" repräsentiert.

IgE ist im Serum und in Sekreten in erheblich geringerer Konzentration als die anderen Ig (Ausnahme IgD) enthalten. Es bildet keine Polymere und kann auch nicht mit C' reagieren. Mit einem MW von ca. 200000 ist es etwas schwerer als die monomeren Ig anderer Klassen.

Molekulare IgE-AK haben als zytophile AK die einzigartige Fähigkeit, sich an die Oberfläche von Mastzellen und Basophilen zu binden. Aufgrund dieser Eigenschaft können sie die allergischen Reaktionen vom Reagin-Typ nach Antigenkontakt auslösen. Die IgE-AK binden sich über das Fc-Teil an die Gewebe-Mastzellen und an die basophilen Blutzellen. Auch hier sind zur spezifischen Reaktion der AK wieder zwei Moleküle notwendig: Erst die brückenartige Verbindung zweier IgE-Moleküle durch das Allergen veranlasst die allergische Reaktion (32).

Es gibt auch Beweise für freie IgE-Moleküle in den Epithelzellen der Bronchialmukosa. Diese molekularen, nicht-zellgebundenen AK spielen möglicherweise eine herausragende Rolle in der primären Abwehr der Allergene. Die Konzentration von IgE in Nasen- und Bronchialsekreten sind höher als im Blut, was vermuten läßt, daß dieses Ig auf ähnliche Art und Weise wie das IgA in die respiratorische Mukosa sezerniert wird (9). Es konnte gezeigt werden, daß die Synthesen von IgA und IgE miteinander verkoppelt sind und daß ein Mangel an diesen AK einhergeht mit sinopulmonalen Infektionen.

Die Reagine werden auch als "atopische" AK bezeichnet, weil sie bei den sogen. atopischen Erkrankungen, denen Überempfindlichkeits-Reaktionen vom Sofort-Typ zugrunde liegen, gehäuft auftreten.

Signifikant erhöhte IgE-Spiegel bestehen besonders bei Asthma bronchiale (60%), beim Heuschnupfen (30%) und besonders bei Neurodermitis (80%).

e) IgD

Das IgD ist ebenso wie das IgE ein erst in jüngster Zeit bekannt gewordenen Ig. Es wurde in einigen sehr seltenen Myelomformen nachgewiesen. In normalem Serum kommt es in nur verschwindend geringen Mengen vor und es ist nicht bekannt, ob mit dieser Ig-Klasse überhaupt eine AK-Aktivität verbunden ist.

C. ERGEBNISSE

Sputen verschiedener Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen wurden untersucht auf Ig und eventuelle Bruchstücke bzw. Abbauprodukte von Ig.

I. Ausgangsmaterial

Das Ausgangsmaterial wurde geprüft durch die Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony und mit der Immunelektrophorese.

1. Ergebnis der DID

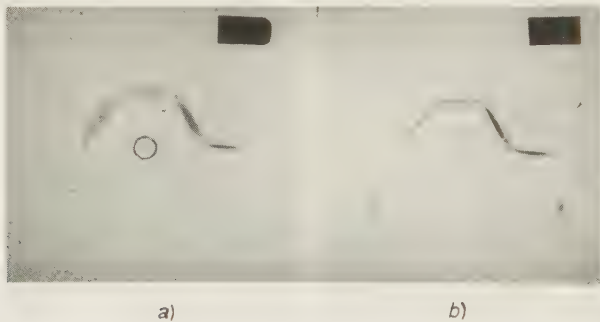


Abb. 4 - DID vom Ausgangsmaterial (Pat.L. und Pat.S.)
zentral: a) Sputum Pat.L., b) Sputum Pat.S.
peripher: Antisera, jeweils von oben im Uhrzeigersinn: A-IgG, A-Fab, A-IgM, A-IgA, A-Fd und A-Fc.

In beiden Sputen war kein IgM nachweisbar.

Mit Antisera gegen IgG, Fab- und Fc- Fragment zeigte sich in beiden Sputen ein starkes Präzipitat.

Gegen A-Fd war in beiden Fällen nur ein sehr schwaches Präzipitat zu erkennen (wenn überhaupt), während IgA nur bei Patient L. nachweisbar schien.

2. Ergebnis der Immunelektrophorese

Die I.E.-Bilder beider Sputen zeigt Abb. 5.

Auf die in der qualitativen DID nur sehr schwach bzw. überhaupt nicht darstellbaren IgA und IgM wurde verzichtet.

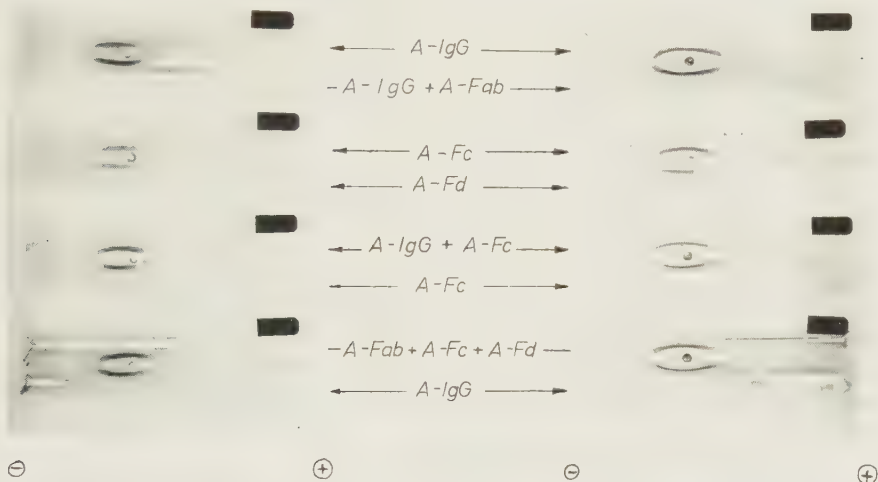


Abb. 5 - Immunelektrophorese der Sputen.

li.: Pat.S.; re.: Pat.L.

In der I.E. ergaben sich Präzipitate mit allen verwendeten Antisera bzw. Antisera-Gemischen.

Die Präzipitatabögen erschienen jedoch nicht wie bei der Darstellung intakter Ig immer als eine einheitliche Linie, sondern zeigten sowohl Doppelbögen als auch Auffächerung am Präzipitatende. Doppelbögen bildeten sich anodenwärts mit A-IgG und A-Fc, ebenso mit Antisera-Gemischen, in denen A-IgG oder A-Fc enthalten waren (deutlich auf Plättchen 5 oben mit A-IgG und auf Plättchen 7 unten mit A-Fc).

Leichte Auffächerungen zeigten sich kathodenwärts deutlich gegen das Gemisch aus A-Fab, A-Fc und A-Fd (Plättchen 8 oben). Zeigte die DID lediglich die Existenz verschiedener Antigen-Determinanten des IgG, die sowohl vom Fc- als auch vom Fab-Teil intakter IgG-Moleküle stammen konnten, so ergab die I.E.

bereits Hinweise auf Spalt- bzw. Abbauprodukte von IgG: Das physiologische, heterogene Gemisch aus sämtlichen IgG-Subklassen ergibt, unverändert, immer eine typische, nicht unterbrochene Präzipitatlinie. Die hier anodenwärts liegenden, zusätzlichen schwächeren Präzipitate müssen somit von veränderten, jedoch IgG-ähnlichen Proteinen stammen, in denen mehr negative Ladungen wirksam werden als in den intakten IgG-Molekülen. Diese größere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit ist nur erklärbar durch Umbau-, Abbau- oder Spaltvorgänge innerhalb des Ig-Moleküls. Die zur Kathode hin an den Präzipitatenden liegenden Auffächerungen und Spornbildungen scheinen ebenso von Veränderungen im Ig her-zukommen.

Um solche Veränderungen im Sinne von Abbau- oder Spaltvor-gängen zeigen zu können, war es notwendig, Ig-Fragmente oder Ig-ähnliche Proteine mit kleinerem MW nachzuweisen. Hierfür wurde ein Gemisch der Sputen säulenchromatogr. untersucht.

II. Säulenchromatographie von Sputum

1. Fraktionierungskurve

Abb.6 zeigt die Eluatskurve von Sputum.

2. Eichkurve zur Bestimmung des MW

In einem Testlauf ergaben sich für verschiedene in ihrem MW definierten Substanzen folgende

Eluatsvolumina und Kav-Werte von

	v_e (ml)	Kav	MW $\times 10^3$	
Dextran-Blau	407	0	1000	$v_o = 407 \text{ ml}$
IgA-Standard	570	0,19	160	
Albumin	779	0,44	68	$v_t = 1258 \text{ ml}$
Chymotrypsinogen	1042	0,75	23	$Kav = \frac{v_e - v_o}{v_t - v_o}$
Cytochrom C	1193	0,92	13	

Die nach diesen Werten erstellte Eichkurve zur Bestimmung des MW zeigt die Abb.7 .

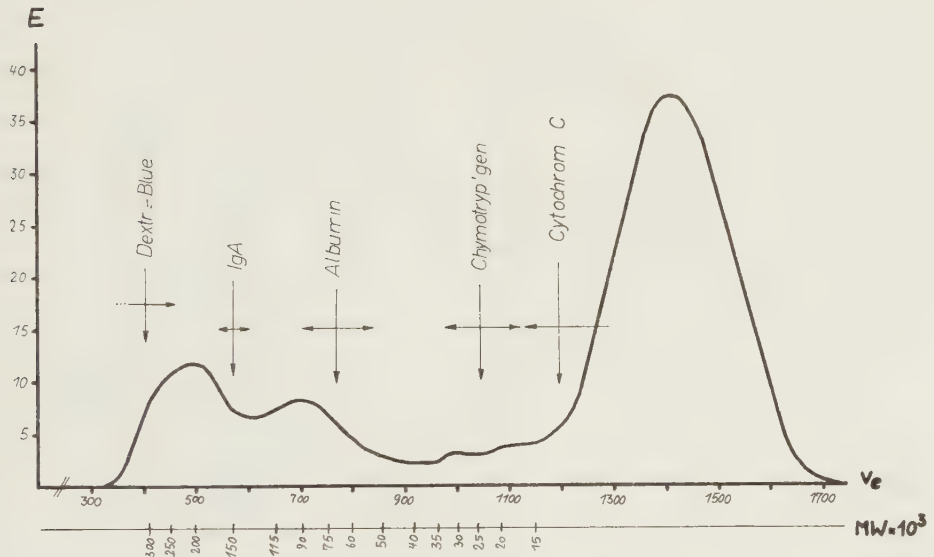


Abb. 6 - Chromatographie von Sputum in Sephadex G-200.

Säule: 100 x 4 cm.

Elutionsrate: 6,1 ml/Fraktion.

Fließmittel: 0,05m Borat-, 0,2m NaCl-Puffer,
pH 8,0.

Auf der Abszisse sind zu einigen Elutionsvolumina die zugehörigen MW eingetragen. Die waagrechten Pfeile geben den Volumenbereich an, in dem die Testsubstanzen im Eluat erschienen, die senkrechten Pfeile zeigen das jeweilige Maximum.

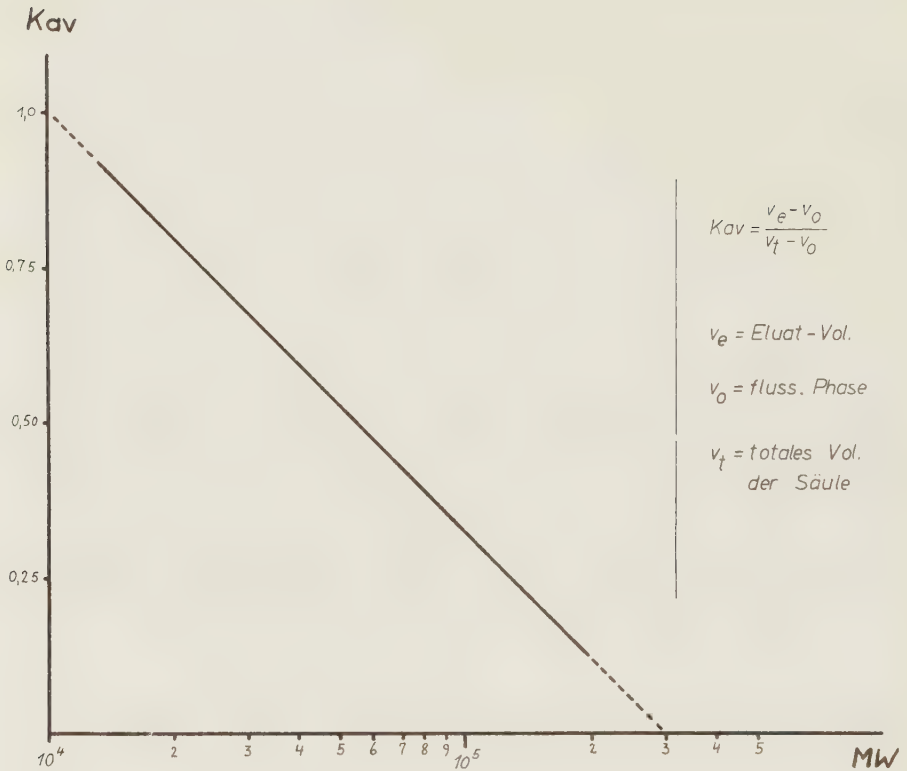


Abb. 7 - Eichkurve zur Bestimmung des MW.

Ordinate: K_{av} linear aufgetragen.

Abszisse: MW logarithmisch aufgetragen.

3. MW in den Fraktionen

Das MW der einzelnen Fraktionen kann nun nach Errechnung der Kav-Werte leicht aus der Kurve abgelesen werden (Tab.3).

Frkt.	v_e	Kav	MWx10 ³	Frkt.	v_e	Kav	MWx10 ³
68	415	0,009	290	130	793	0,455	65
70	427	0,02	270	132	805	0,47	61
72	439	0,04	255	134	817	0,48	59
74	452	0,05	245	136	830	0,495	56
77	470	0,07	230	138	842	0,51	53
79	482	0,08	220	140	854	0,525	51
81	494	0,10	205	142	866	0,54	49
83	506	0,12	190	144	878	0,55	47
85	518	0,13	185	146	891	0,57	44
88	537	0,15	175	148	903	0,58	42
90	550	0,17	165	150	915	0,60	39
92	562	0,18	160	152	927	0,61	38
94	575	0,195	150	154	940	0,625	36
96	587	0,21	145	156	952	0,64	35
98	599	0,22	140	158	964	0,655	33
100	610	0,24	130	160	976	0,67	31
102	622	0,25	125	162	988	0,68	30
104	634	0,27	120	164	1001	0,70	28
106	647	0,28	115	166	1013	0,71	27
108	659	0,295	110	168	1025	0,725	26
110	671	0,31	105	170	1037	0,74	25
112	683	0,32	98	172	1049	0,75	24
114	695	0,34	94	174	1061	0,77	23
116	707	0,35	90	176	1073	0,78	22
118	720	0,37	85	178	1086	0,80	20,5
120	732	0,38	82	180	1098	0,81	19,5
122	744	0,395	78	182	1110	0,825	19
124	756	0,41	75	184	1122	0,84	18
126	769	0,425	71	186	1135	0,85	17,5
128	781	0,44	68	190	1159	0,88	16

Tab. 3 - Das MW der einzelnen Fraktionen mit den Kav-Werten und den Eluatsvolumina.

Das MW als Funktion des Eluatvolumens zeigt Abb.8.

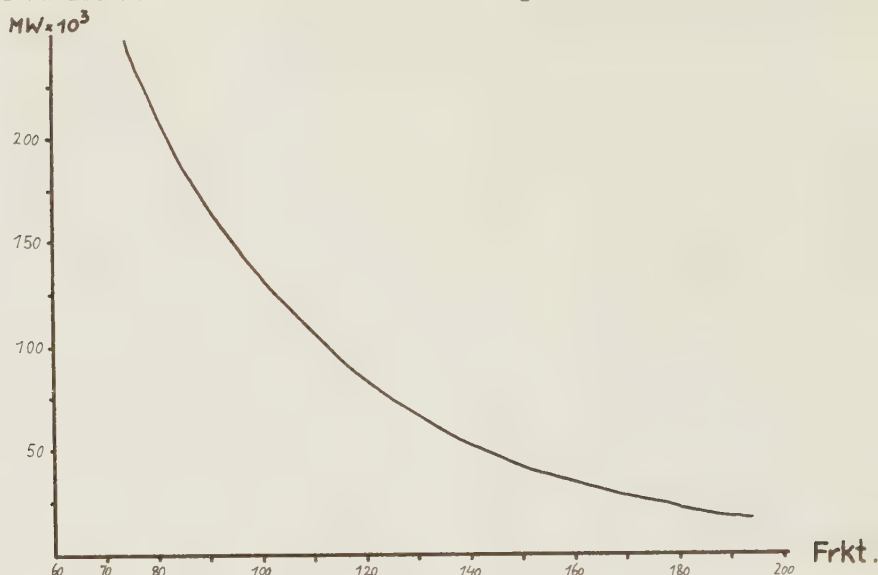


Abb. 8 - Das MW als Funktion des Eluatvolumens.

III. Nachweis von Ig und Ig-Fragmenten in den Fraktionen

1. Qualitativer Nachweis mit der DID (Ouchterlony)

Die nun nach ihrem MW unterschiedenen Ig und Ig-Fragmente wurden mit den o.a. Antisera getestet.

Die Resultate der qualitativen Analyse sind in Abb.9 schematisch wiedergegeben.

IgA war hier in einem Bereich nachweisbar, der weitgehend mit dem Testlauf, wo standardisiertes Serum-IgA verwendet wurde, übereinstimmte:

Während IgA im Testlauf in einem MW-Bereich von ca. 195000 bis 125000 nachweisbar war, erschien es bei der Sputum-Analyse in einem weitaus größerem Bereich, nämlich von ca. 270000 bis ca. 125000 (entsprechend Frakt. 102). In den höheren Fraktionen und einem MW von kleiner als 125000 war mit A-IgA kein Präzipitat mehr zu erzielen.

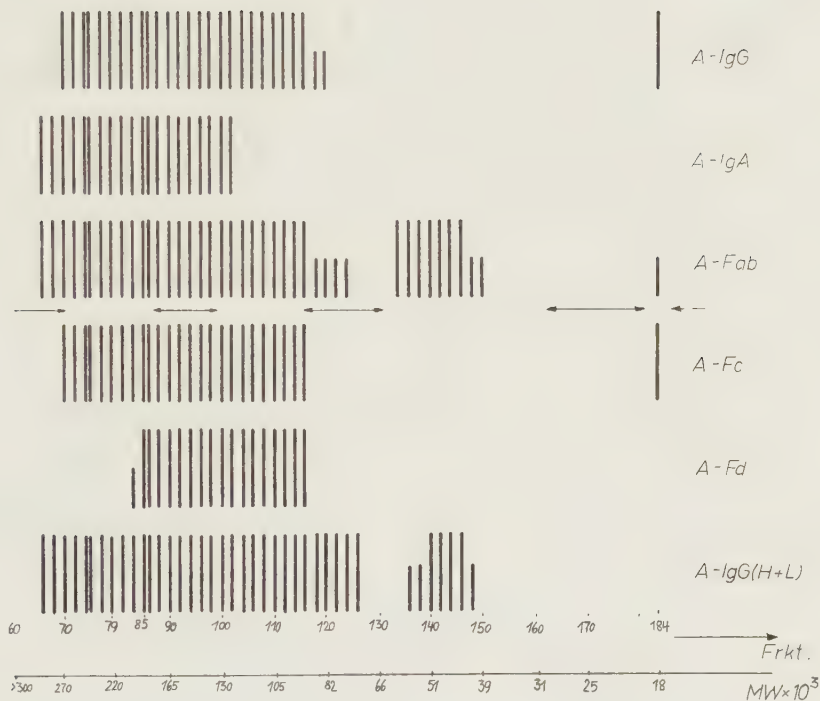


Abb. 9 - Schematische Darstellung der qualitativen Analyse der Sputum-Fractionen.
 Große Balken bedeuten starkes, eindeutig zu erkennendes Präzipitat.
 Kleine Balken stehen für schwache bis gerade noch erkennbare Präzipitate.
 Am unteren Rand sind Werte für das MW angegeben, waagrechte Pfeile in der Mitte zeigen den Bereich, in dem die Testsubstanzen auftraten.

IgG erschien wie IgA bei einem MW von ca. 270000. Mit A-Fd war ein Nachweis jedoch erst ab MW 190000 zu führen. Darüber hinaus waren IgG bzw. IgG-Determinanten noch bei signifikant geringerem MW als IgA oder IgA-ähnliche Proteine nachzuweisen. Mit sämtlichen Antisera gegen IgG und IgG-Fragmente zeigte sich ein Präzipitat bis Frkt. 116, entspr. einem MW von 90000; mit A-IgG war es bis MW 82000 (Frkt. 120) und mit A-Fab und A-IgG(H+L) sogar noch bis MW 70000 (Frkt. 126) zu erkennen. Bereits diese Befunde unterscheiden sich klar vom Ergebnis für IgA, das nur bis zu einem MW von 125000 mit seinem Antiserum reagierte.

Entscheidend für den Nachweis von Ig-Bruchstücken waren jedoch deutliche Präzipitat-Linien

a) der Frkt. 134 bis 150, bzw. MW 59000 bis 39000 und

b) der Frkt. 184, bzw. MW 18000.

Diese signifikanten und aussagekräftigen Präzipitate ergaben sich für a) nur mit A-Fab im gesamten angegebenen Intervall; mit A-IgG(H+L) reagierte noch ein Teil dieser Fraktionen positiv, während alle anderen genannten Antisera keine Reaktion zeigten (Abb. 9).

Das Präzipitat der Fraktion 184 war deutlich hervortretend mit A-IgG und A-Fc, etwas schwächer mit A-Fab. In jedem Falle waren die Niederschläge dieser Fraktionen aber völlig isoliert, d.h. die ebenfalls untersuchten Nachbarfraktionen zeigten in keinem Falle auch nur ein schwaches Präzipitat.

2. Quantitativer Nachweis mit der RID (Mancini)

a) Die Eichung der Platten (LC-Platten) erfolgte mit folgenden Konzentrationen der Standard-Ig:

		D	D ²			D	D ²
IgG _I	≅ 1,5 mg%	5,3	28,1	IgA _I	≅ 1,3 mg%	5,4	29,2
IgG _{II}	≅ 5,0 mg%	7,2	51,9	IgA _{II}	≅ 5,2 mg%	6,9	47,6
IgG _{III}	≅ 10,0 mg%	9,2	84,7	IgA _{III}	≅ 10,4 mg%	8,5	72,3

Mit diesen Werten wurde die Eichkurve der Abb.10 erstellt.

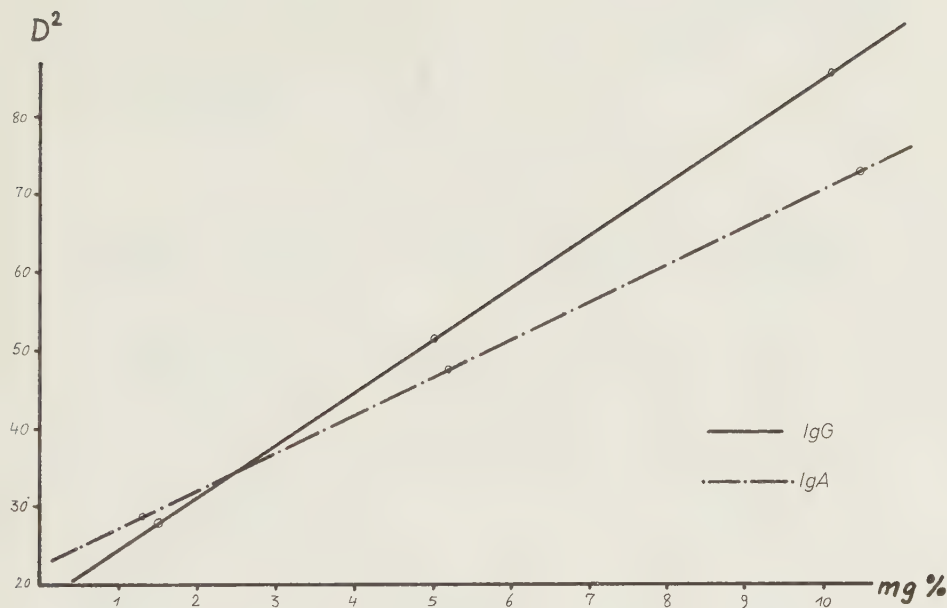


Abb. 10 - Eichkurven zur Bestimmung der absoluten Ig-Konzentrationen in den Fraktionen.

b) Die absoluten Konzentrationen für IgG in den Fraktionen (in $mg\%$) gewonnen aus der Eichkurve der Abb. 10 zeigt die Tabelle 4.

Zur einfachen Bestimmung dieser Konzentrationswerte mit einem Taschenrechner wird der quadrierte Durchmesser der Hemmkreise als eine Funktion der Konzentration dargestellt:

$$D^2 = m \times \text{Konz.} + c$$

m ergibt sich aus den gemessenen Werten und ist für jede einzelne Eichgerade konstant:

$$m = \frac{D^2_{\text{IgG}_{III}} - D^2_{\text{IgG}_{II}}}{\text{Konz}_{\text{IgG}_{III}} - \text{Konz}_{\text{IgG}_{II}}}$$

c ist ebenfalls für jede einzelne

Eichung konstant:

$$c = D^2 - m \times \text{Konz.}$$

Für m und c ergibt sich hier

$$m = 6,55$$

$$c = 19,1$$

Die Konzentrationen können nun anhand der einfachen Beziehung

$$\text{Konz} = \frac{D^2 - c}{m}$$

für jede Fraktion mit dem Elektronenrechner bestimmt werden.

Frkt.	D	D ²	Konz	Frkt.	D	D ²	Konz
64	4,5	20,3	0,17	104	8,8	77,4	8,9
66	5,2	27,0	1,21	106	7,5	56,3	5,7
68	5,2	27,0	1,21	108	15,0	225,0	31,4
70	8,8	77,4	8,9	110	10,8	116,6	14,9
72	10,1	102,0	12,7	112	12,5	156,3	20,9
74	7,5	56,3	5,7	114	7,5	56,3	5,7
75	6,5	42,3	3,5	116	8,5	72,3	8,1
77	16,0	256,0	36,2	118	5,5	30,3	1,7
79	11,0	121,0	15,6	120	5,5	30,3	1,7
81	10,1	102,0	12,7	122	5,0	25,0	0,9
83	12,1	146,4	19,4	124	4,5	20,3	0,1
85	16,0	256,0	36,2	126-130	0	0	-
86	9,8	96,0	11,7	132	5,0	25,0	0,9
88	13,0	169,0	22,9	134	6,8	46,2	4,1
90	>16	>256	>36	136-182	0	0	-
92-100	>16	>256	>37	184	7,8	60,5	6,3
102	14,5	210,3	29,2	ab 186	0	0	-

Tab.4 - Absolute Konzentrationen für IgG in den Frakt.

c) Die absoluten Konzentrationen für IgA in den Frakt. (in mg%)

gewonnen aus der Eichgeraden der Abb.10 zeigt die Tabelle 5.
Zur einfachen Berechnung der Konzentrationen wurde wieder die
Beziehung analog b) verwendet.

Mit den Eichwerten für IgA ergaben sich für

$$m = 4,73$$

$$c = 23,0$$

Frkt.	D	D ²	Konz	Frkt.	D	D ²	Konz
64	5,5	30,3	1,5	130	16,0	256,0	49,3
66	8,5	72,3	10,4	132	15,0	225,0	42,7
68	15,0	225,0	42,7	134	13,0	169,0	30,9
70	15,0	225,0	42,7	136	9,5	90,3	14,2
72	7,5	56,3	7,0	138	10,0	100,0	16,3
74	9,0	81,0	12,3	140	9,5	90,3	14,2
75	15,0	225,0	42,7	142	9,9	98,0	15,9
77	9,5	90,3	14,2	144	9,2	84,6	13,0
79	13,0	169,0	30,9	146	8,5	72,3	10,4
81	14,5	210,3	39,6	148	9,0	81,0	12,3
83	10,5	110,3	18,4	150	6,2	38,4	3,3
85	7,5	56,3	7,0	154	7,0	49,0	5,5
86	14,0	196,0	36,6	156	7,1	50,4	5,8
88	10,0	100,0	16,3	158	7,1	50,4	5,8
90	6,5	42,3	4,1	160	6,3	39,7	3,5
92	11,0	121,0	20,7	164	6,2	38,4	3,3
94	9,0	81,0	12,3	166	5,9	34,8	2,5
96	9,0	81,0	12,3	168	4,8	23,0	0
98	7,2	51,8	6,1	170	4,7	22,1	0
100	6,5	42,3	4,1	172	5,3	28,1	1,1
102	7,0	49,0	5,5	176	4,5	20,3	0
104	4,0	16,0	0	182	5,8	33,6	2,2
106	4,8	23,0	0	184	4,9	24,0	0,2
108	4,7	22,1	0	190	4,8	23,0	0
110-128	-	-	-				

Tab. 5 - Absolute Konzentr. in den Frakt. für IgA.

Die in den Tabellen 4 und 5 enthaltenen Konzentrationswerte wurden in Diagrammen dargestellt.

Die Abb.11 zeigt die Konzentrationen für IgG, die Abb.12 die Konzentrationen für IgA, jeweils in den einzelnen Fraktionen.

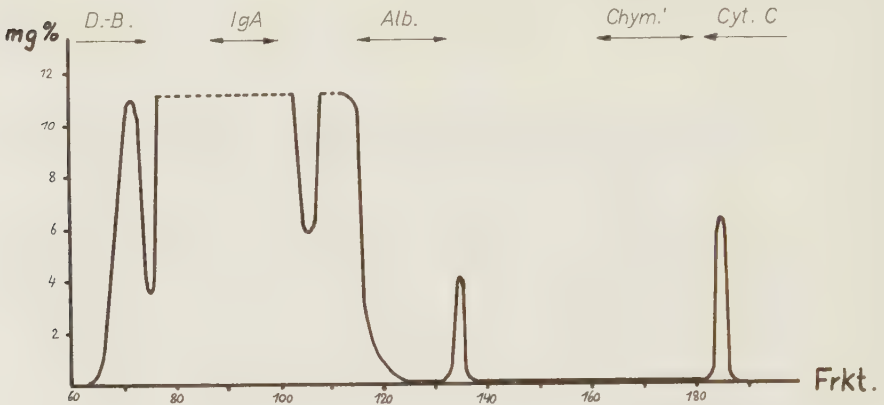


Abb. 11 - Absolute Konzentrat. der Frakt. für IgG.

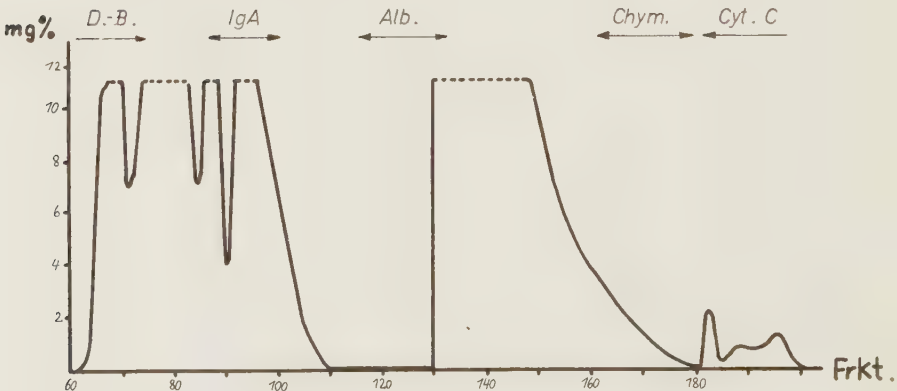


Abb. 12 - Absolute Konzentrat. der Frakt. für IgA.

Für IgG ergaben sich bestimmbare Konzentrationen bereits ab Fraktion 64. In der graphischen Darstellung (Abb.11) ist ein breiter Peak zu erkennen, der sich bis Fraktion 124 erstreckt, an zwei Stellen jedoch, bei Fraktion 75 (MW 240000) und Fraktion 106 (MW 115000), klar gezackt erscheint. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Resultat der DID überein, wo Präzipitate mit A-IgG bis Fraktion 120 und mit A-Fab bis Fraktion 126 erschienen.

Die Präzipitate der Fraktionen 134 bis 150, wie sie bei der qualitativen Bestimmung mit A-Fab auftraten, waren bei der RID jedoch nur in den Fraktionen 132 und 134 zu bestätigen. Die weiteren Fraktionen ergaben mit den LC-Partigen-Platten keine messbaren Konzentrationen.

In den hohen Fraktionen war wie bei der DID keine Reaktion sichtbar mit Ausnahme der Fraktion 184: Diese zeigte hier mit 6,3 mg% einen signifikant höheren Wert als die beiden Nachbarfraktionen, die überhaupt keinen Hemmkreis ergaben. Dieses Ergebnis war somit in voller Übereinstimmung mit dem der DID.

Für IgA waren ebenfalls ab Fraktion 64 Konzentrationswerte zu bestimmen. Zwischen Fraktion 64 und 110 (bis MW 105000) war ein Bereich, in dem jede getestete Fraktion eindeutige Hemmkreise zeigte. An drei Stellen (Frakt. 72, 85 und 90) waren die Konzentrationen jedoch bedeutend geringer als bei den benachbarten Fraktionen, sodaß in der graphischen Darstellung vier Peaks nebeneinander erschienen (Abb.12). Obwohl in der DID IgA nur bis Fraktion 102 (MW 125000), hier aber bis Fraktion 110 (MW 105000) auftrat, bestätigen sich diese Ergebnisse doch weitgehend.

Die quantitative Bestimmung zeigte zwischen den Fraktionen 130 und 180 einen weiteren Peak. Dieses Resultat, klare Hemmkreise mit einem Maximum bei MW 65000 bis 39000, war in der DID jedoch nicht bestätigt. Auffallend war der Bereich, in dem das Maximum dieses Peaks lag: Es waren die gleichen Fraktionen, die mit A-Fab und teilweise auch mit A-IgG(H+L) bei der DID präzipitierten.

3. Nachweis von Ig-Fragmenten mit der Immunelektrophorese

Das Ergebnis der I.E. mit einigen ausgewählten Fraktionen zeigt die Abb.13.

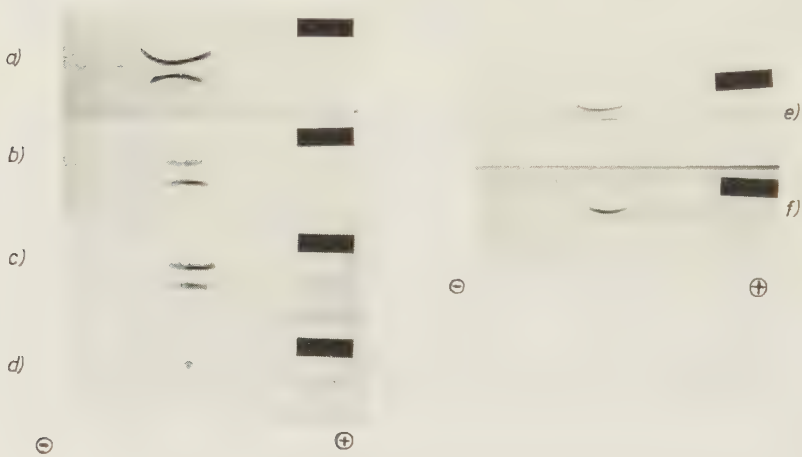


Abb. 13 - I.E. einiger Sputum-Fraktionen.

Antiserum linke Reihe: A-IgG

Antiserum rechte Reihe: A-IgA.

a) oben: IgG, unten: Frkt. 77,

b) oben: Frkt. 85, unten: Frkt. 90,

c) " : " 108, " : " 112,

d) " : " 136, " : " 152,

e) " : IgA, " : " 75,

f) " : Frkt. 86, " : " 130.

Im Vergleich zu normalem IgG zeigten die getesteten Substanzen eine geringere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit. Fraktion 77 (MW 230000) erscheint im Vergleich zum normalen IgG fast unverändert. Die Fraktionen 85 und 90 (MW 175000), die eigentlich dem intakten IgG entsprechen sollten, zeigten verkürzte Präzipitatlinien wie sie bei nicht mehr vollständigen Molekülen auftreten. Die gleichen Phänomene

sieht man bei Fraktion 108 und 112.

Fraktion 136 ist nur noch sehr schwach zu erkennen, während Fraktion 152 in der I.E. kein Präzipitat zeigt.

Mit A-IgA ergab Fraktion 75 nur den anodenwärts liegenden Teil des Präzipitats von normalem IgA. Fraktion 86 dagegen (MW etwa wie intaktes IgA) erscheint im Vergleich zu normalem IgA unverändert. Die Fraktion 130, die bei der RID eine große IgA-Konzentration zu besitzen schien, zeigte hier in der I.E. ebenso wie Fraktion 152 kein Präzipitat.

4. Untersuchung auf verschiedene Antigen-Determinanten

Mit der Duchterlony-Methode wurden folgende Fraktionen der Sputum-Chromatographie auf verschiedene Antigen-Determinanten von IgG untersucht:

72, 78, 84, 98, 108, 112, 126, 136, 146, 184.

Die Abb. 14 zeigt die dabei unterscheidbaren Antigen-Determinanten.

Mit A-IgG (a), A-Fc und A-Fd (d) waren keine Überspornungen zu erzielen.

Mit A-IgG(H+L) war eine Spornbildung sichtbar zwischen Fraktion 146 und Fraktion 108, wobei Nr.146 schwach überlappt wurde.

Klare Spornbildungen zeigten sich jedoch nur mit A-Fab (b): Sofort zu erkennen waren sie bei IgG gegen Fraktion 146 (re. oben), bei Fraktion 98 gegen Fraktion 136 und bei Fraktion 98 gegen Fraktion 146 (unten Mitte).

Da das mehr defiziente bzw. mehr abgebaute und mehr veränderte Molekül vom vollständigerem Überspornt wird, weil es nicht mehr alle Antigen-Determinanten dieses Moleküls besitzt, kann man sagen:

IgG-ähnliche Moleküle in Fraktion 146 haben nur noch einen Teil der Antigen-Determinanten des intakten IgG. Ebenso sind diese Fragmente im Vergleich zu den Molekülen der Fraktion 98 nicht mehr vollständig. Auch gegenüber Fraktion 108 ist Fraktion 146 bereits defizient wie oben rechts erkennbar.

In Fraktion 136 sind ebenfalls stärker abgebaute Proteine enthalten, was sich in einem schwachen Sporn mit Fraktion 98 zeigt. Eine weitere Überspornung erkennt man zwischen der

Fraktion 112 und IgG (rechts unten). Hier sind die Globuline von Fraktion 112 (MW 97000) verglichen mit intaktem IgG teilweise defizient und ein anderer Teil scheint noch die gleichen Antigen-Determinanten wie das ursprüngliche Molekül zu besitzen.

Vergleicht man aber Fraktion 98 direkt mit IgG, so stellt man eine nahezu völlige Identität fest, erkennbar an der Fusion beider Präzipitatlinien. Dies erscheint richtig, da beim Eichen der Säule das normale IgA auch in diesen Fraktionen erschien.

Volle Identität der Antigen-Determinanten scheint für die Fraktionen 78 und 84 auch vorzuliegen mit A-Fab.

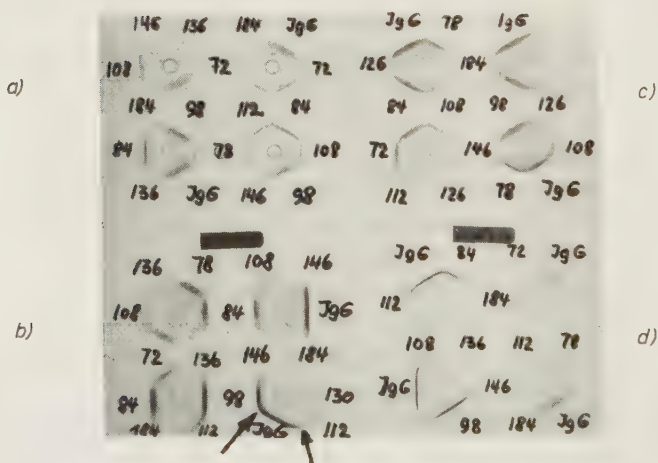


Abb. 14 - Verschiedene Antigen-Determinanten von IgG. Die Fraktionszahl ist an der jeweiligen Auftragstelle eingetragen. Antisera wurden in die zentralen Auftragstellen gegeben: a) A-IgG, b) A-Fab, c) A-IgG(H+L), d) beide linke Zentren: A-Fc, beide rechte Zentren: A-Fd.

IV. Serum-Chromatographie

Die Auswertungen der Sputum-Chromatographie zeigten eindeutig abgebaute, unvollständige bzw. gespaltene Ig mit teilweise erhaltener Antigenstruktur.

Die Existenz solcher Fragmente im Sputum muß jedoch nicht zwangsläufig dem lokalen Geschehen in den obstruierten Luftwegen entstammen, sondern die Ig-Fragmente bzw. Ig-Rudimente könnten ebenso aus dem Serum dieser Patienten ausgetreten sein. Zur Klärung dieser Frage wurde deshalb Serum eines gesunden Menschen in der gleichen Weise aufgetrennt und mit der DID untersucht.

1. Fraktionierungskurve von Serum

Die Fraktionierungskurve von Serum ist in Abb.15 dargestellt.

2. Eichkurve zur Bestimmung des MW

Für die Testsubstanzen ergaben sich folgende Eluatsvolumina und Kav-Werte:

	v_e (ml)	Kav	MW $\times 10^3$	
Dextran-Blau	506	0	1000	$v_o = 506 \text{ ml}$ $v_t = 1520 \text{ ml}$
IgA-Standard	691	0,182	160	
Albumin	896	0,385	68	$Kav = \frac{v_e - v_o}{v_t - v_o}$
Chymotrypsinogen	1216	0,70	23	
Cytochrom C	1357	0,84	13	

Die Eichkurve aus diesen Werten zeigt Abb.16 .

3. MW in den Fraktionen

Das MW der einzelnen Fraktionen kann nun nach Errechnen der Kav-Werte aus der Kurve in Abb.16 bestimmt werden.

In der Tabelle 6 sind die MW der einzelnen Serum-Fractionen enthalten.

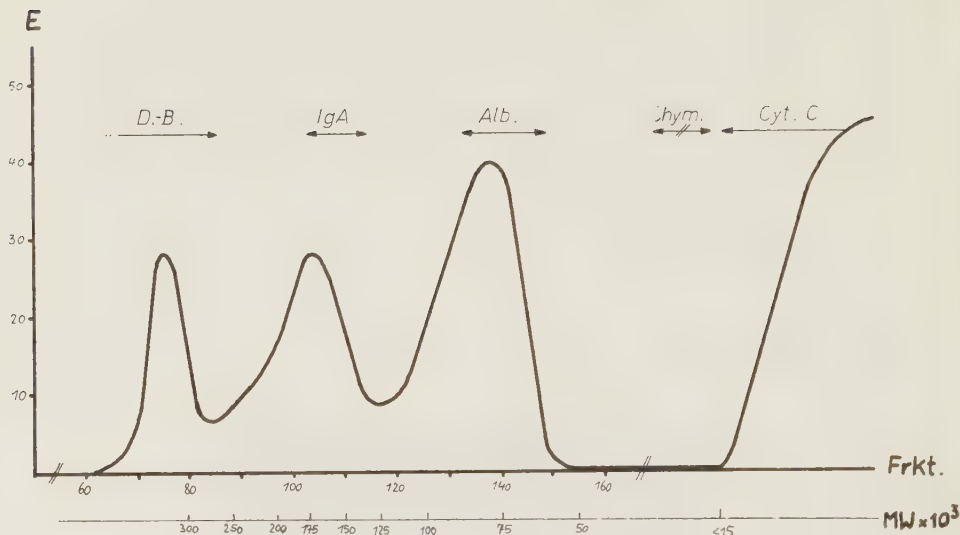


Abb. 15 - Chromatographie von normalem Human-Serum
in Sephadex G-200.

Säule: 121 x 4 cm.

Elutionsrate: 6,4 ml/Fraktion.

Fließmittel: 0,05m Borat-, 0,2m NaCl-
puffer, pH 8,0 .

Auf der Abszisse sind unter einigen Fraktionen die zugehörigen MW eingetragen.
Die waagrechten Pfeile zeigen den Bereich, in dem die Testsubstanzen bei der Eichung erschienen.

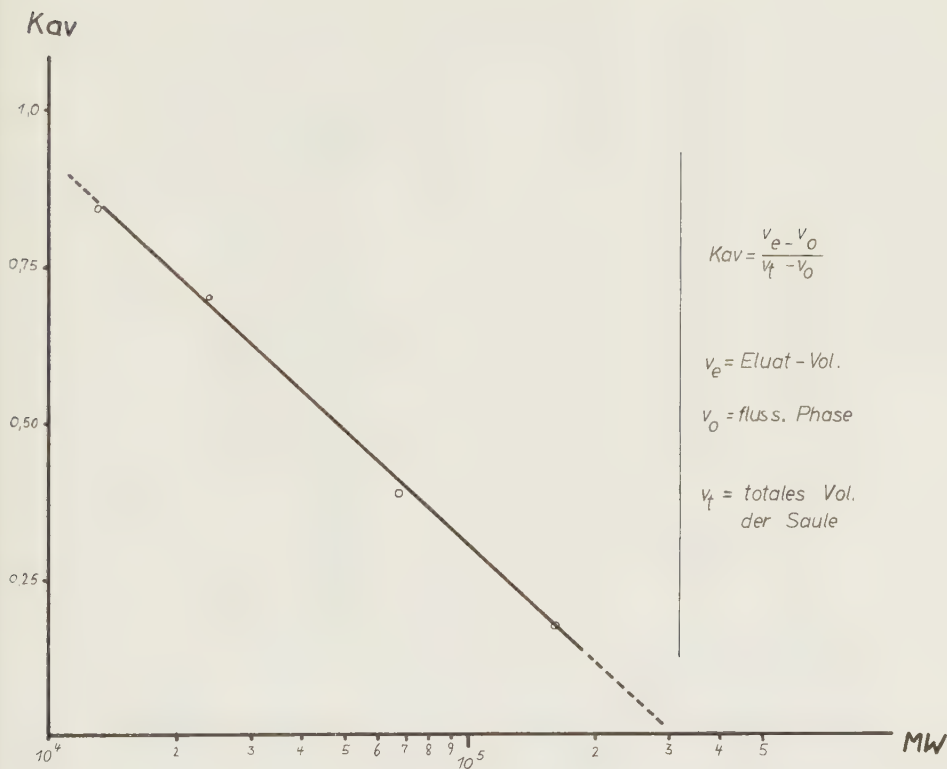


Abb. 16 - Eichkurve zur Bestimmung des MW.
 Ordinate: K_{av} linear aufgetragen.
 Abszisse: MW logarithmisch aufgetragen.

Frkt.	Kav	MW $\times 10^3$	Frkt.	Kav	MW $\times 10^3$
76	0	310	142	0,397	71
79	0	310	145	0,416	66
82	0,02	285	148	0,435	61
85	0,04	265	151	0,454	57
88	0,056	250	154	0,473	53
91	0,075	230	157	0,492	49
94	0,094	220	160	0,511	46
97	0,113	200	163	0,529	43
100	0,132	190	166	0,549	39
103	0,151	175	169	0,567	37
106	0,17	165	172	0,586	35
109	0,188	152	175	0,605	32,5
112	0,207	142	178	0,624	30
115	0,226	132	181	0,643	28
118	0,246	124	184	0,662	26
121	0,265	115	187	0,681	24
124	0,283	105	190	0,70	22,5
127	0,302	100	193	0,719	21
130	0,321	94	196	0,738	19,5
133	0,34	88	199	0,757	18,5
135	0,359	81	202	0,776	17
139	0,378	76			

Tab. 6 - MW der Serum-Fraktionen.

4. Auswertung mit der DID

Mit der DID wurde der Bereich bestimmt, in dem die IgG- und IgA-AK bzw. deren Fragmente aus normalem Humanserum nachweisbar waren.

Die Ergebnisse sind in Abb.17 enthalten.

Mit sämtlichen Antisera waren ab Fraktion 103, entsprechend einem MW von 175000, Präzipitate zu erzielen.

IgA erschien nur in einem recht kleinen Bereich zwischen Fraktion 103 und 112; die untere Grenze entspricht einem MW von 142000. Auffallend bei diesem Test war, daß mit den Antisera gegen IgG oder IgG-Fragmente Präzipitate auftraten bis zu

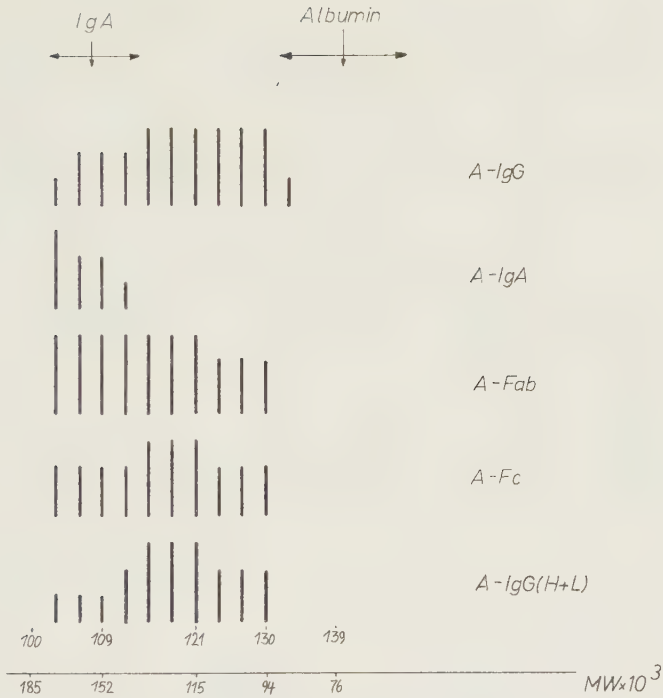


Abb. 17 - Schematische Darstellung der qualitativen Analyse der Serum-Fractionen. Große Balken bedeuten eindeutiges Präzipitat, kleine Balken schwaches, gerade noch erkennbares Präzipitat. Unter den Fraktionszahlen sind MW-Angaben aus Tabelle 6 übernommen.

einem MW von 94000, und das einheitlich für alle genannten Antisera.

Obwohl hier bis zu diesem für intakte IgG zu niedrigem MW IgG-Determinanten nachweisbar waren, kann dies nicht als Beweis für die Existenz von IgG-Fragmenten in normalem Serum betrachtet werden. Dieser Befund dürfte vielmehr darauf zurückzuführen sein, daß in der Säule bei der Auftrennung eine Art "Überladungseffekt" auftrat. Durch die Verdünnung des Serums von 10 ml auf 25 ml und anschließendes Auftragen der gesamten verdünnten Menge des Serums war die primäre Proteinverteilung bereits zu Beginn der Chromatographie über einen zu breiten Gelstreifen fortgeschritten, um sich nicht im Verlauf der Säulenpassage über den angegebenen Bereich zu "verschmieren".

Vergleicht man die Ergebnisse der DIO von Sputum und von Normalserum, so fällt auf, daß die mit A-Fab und A-IgG(H+L) bei der Sputum-Analyse aufgetretenen Fragmente im MW-Intervall von 59000 bis 39000 in der Serum-Untersuchung nicht nachweisbar waren. Auch die mit einigen Antisera erzielten Präzipitate der Fragmente von ca. 18000 MW waren im Serum nicht vorhanden.

Obwohl die verschiedenen Untersuchungsmethoden doch klar zeigten, daß im Ausgangsmaterial, dem Sputumgemisch mehrerer Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen, gespaltene Ig besonders vom IgG-Typ vorliegen, wurde versucht, in einer neuen Auftrennung die bisherigen Ergebnisse zu untermauern. Hierfür wurden vom gleichen lyophilisierten Sputumgemisch wieder die gleiche Menge Substanz verwendet, nach den gleichen Methoden behandelt und die Auswertungen analog der ersten Untersuchung vorgenommen.

Im folgenden Teil wurde auf einige Tabellen und Abbildungen verzichtet, die in ähnlicher Form bereits im vorherigen Abschnitt enthalten sind.

V. Säulenchromatographie von Sputum (II)

1. Fraktionierungskurve

Abb.18 zeigt die Eluatskurve von Sputum; sie unterscheidet sich praktisch nicht vom Ergebnis der ersten Auftrennung.

2. Eichung der Säule

Zur Eichung der Säule wurden wieder die vorher benutzten Testsubstanzen verwendet, die folgende Eluatvolumina und K_{av} -Werte ergaben:

	v_e	K_{av}	$MW \times 10^3$	
10 mg Dextran-Blau	357	0	1000	$v_o = 357 \text{ ml}$
500 μ l IgA-Standard	507	0,182	160	
90 mg Albumin	656	0,363	68	$v_t = 1180 \text{ ml}$
100 mg Chymotrypsinogen	893	0,65	23	$K_{av} = \frac{v_e - v_o}{v_t - v_o}$
10 mg Cytochrom C	1014	0,80	13	

Nach den Werten des Eichlaufs wurde die Eichkurve der Abb.19 erstellt.

3. MW in den Fraktionen

Das MW der Fraktionen wurde nach Errechnen des K_{av} aus der Eichkurve bestimmt (Tabelle 7).

Frkt.	K_{av}	$MW \times 10^3$	Frkt.	K_{av}	$MW \times 10^3$	Frkt.	K_{av}	$MW \times 10^3$
53	0	300	89	0,27	107	125	0,553	34,5
56	0,008	300	92	0,293	98	128	0,577	31,5
59	0,032	275	95	0,317	89	131	0,60	28,5
62	0,056	250	98	0,34	81	134	0,625	26
65	0,08	230	101	0,364	74	137	0,648	23,5
68	0,103	210	104	0,388	68	140	0,672	21,5
71	0,127	190	107	0,41	61	143	0,696	19,5
74	0,15	172	110	0,435	56	146	0,72	18
77	0,174	158	113	0,459	50	149	0,743	16,5
80	0,198	145	116	0,482	46	152	0,767	14,5
83	0,221	130	119	0,506	42	155	0,79	13,5
86	0,245	118	122	0,53	38	158	0,814	13

Tab. 7 - MW der Sputum-Fraktionen.

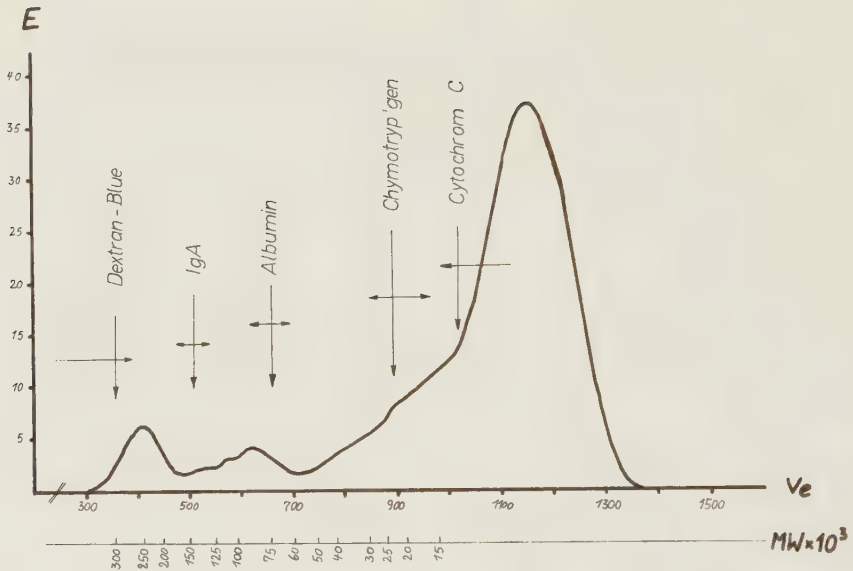


Abb. 18 - Chromatographie von Sputum in Sephadex G-200.

Säule: 94 x 4 cm.

Elutionsrate: 6,4 ml/Fraktion.

Fließmittel: 0,05m Borat-, 0,2m NaCl-

Puffer, pH 8,0 .

Auf der Abszisse sind zu einigen v_e entsprechende MW eingetragen.

Waagrechte Pfeile kennzeichnen den Bereich, in dem die Testsubstanzen erschienen, senkrechte Pfeile zeigen deren Maximum.

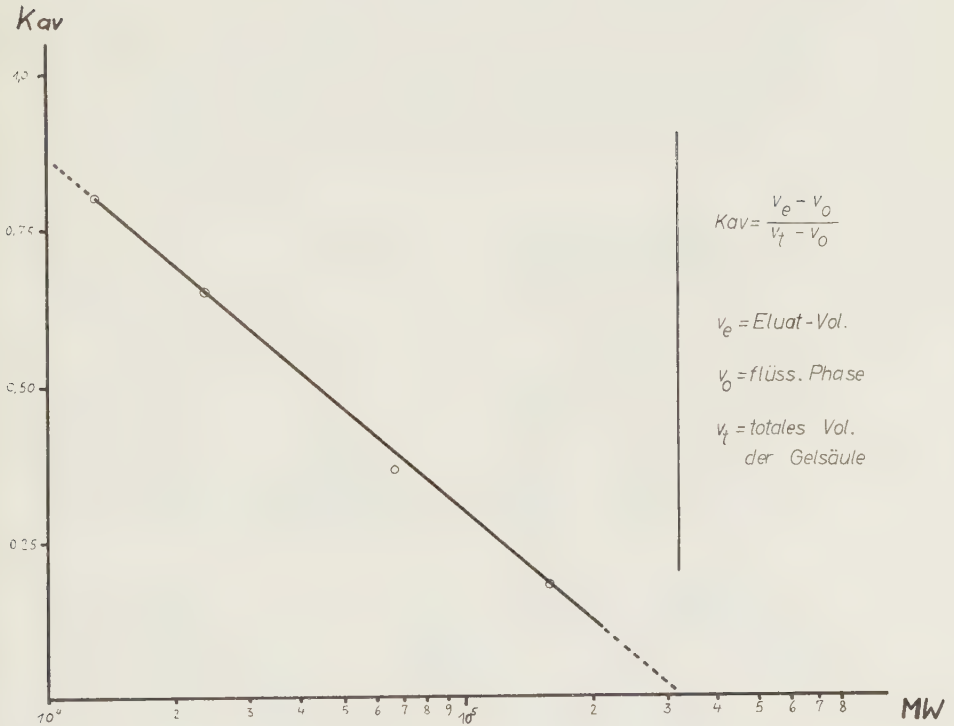


Abb. 19 - Eichkurve zur MW-Bestimmung.

Ordinate: K_{av} linear aufgetragen.

Abszisse: MW logar. aufgetragen.

VI. Nachweis von Ig und Ig-Fragmenten

1. Qualitative Bestimmung mit der DID

Die nun nach ihrer Größe unterschiedenen Ig wurden nun mit den bekannten Antisera getestet. Die Ergebnisse zeigt die Abb.20 . Bei diesem zweiten Test von Sputum auf Ig-Anteile konnten die Ergebnisse der ersten Untersuchung im Prinzip bestätigt werden:

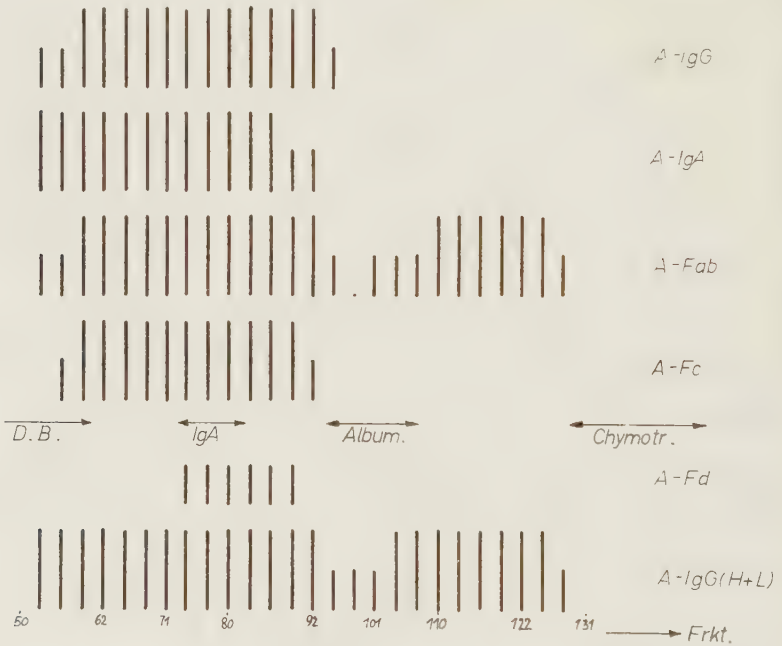


Abb. 20 - Schematische Darstellung der DID-Analyse der Sputum-Fractionen.

Große Balken bedeuten starkes, klares Präzipitat, kleine Balken schwache, gerade noch sichtbare Präzipitate. Waagrechte Pfeile zeigen das Auftreten der Testsubstanzen.

IgA war hier nachweisbar von Fraktion 53 bis 92, entsprechend einem MW von 300000 bis ca. 98000. Berücksichtigt man die ab Fraktion 86 (MW 118000) bereits sehr schwachen Präzipitate, so stimmt das Ergebnis nahezu vollkommen mit der ersten Versuchsreihe überein. Auch jetzt war in den höheren Fraktionen kein IgA oder irgend ein IgA-Rest zu bestimmen. Zum Vergleich stehen im folgenden Absatz die Ergebnisse des ersten Versuchs in Klammern hinter den neuen Werten.

IgG erschien ebenfalls wie IgA im gleichen Intervall, von Fraktion 53 bis 95, entsprechend einem MW bis 89000 (82000). Mit A-Fc war eine Reaktion bis Fraktion 92 bzw. MW 98000 (90000) zu erkennen.

Ähnlich auch waren die Nachweise mit A-Fd: Die Fraktionen 74 bis 89, im MW 172000 bis 107000, reagierten schwach positiv (190000 bis 90000). Mit A-Fab waren diese Reaktionen ebenso deutlich wie mit A-IgG(H+L) bis Fraktion 95 bzw. MW 89000 (70000).

Daneben waren mit diesen beiden Antisera wieder in einem klar niedrigerem MW-Bereich zusätzliche Präzipitate sichtbar:

Sie traten auf mit A-Fab in den Fraktionen 101 bis 128, wobei starke Präzipitate auftraten zwischen den Fraktionen 110 und 125 bzw. zwischen MW 56000 und 35000 (59000 bis 39000). Mit A-IgG(H+L) waren durchgehend bis Fraktion 128 die Reaktionen positiv, massive Niederschläge waren zwischen den Fraktionen 104 und 125 bzw. zwischen MW 68000 und 35000 (59000 bis 44000).

Diese Befunde zeigen weitgehende Übereinstimmung der beiden Versuchsreihen. Im Gegensatz hierzu ließen sich im zweiten Ansatz die Präzipitate mit den niedermolekularen Substanzen von ca. 18000 MW mit keinem der genannten Antisera bestätigen.

2. Quantitative Bestimmung mit der RID

a) Die Tri-Partigen-Platten wurden mit folgenden Konzentrationen der Standard-Ig geeicht:

		D	D ²	Vergl. Stand.-Werte Behringw.	
IgG _I	≅ 22 mg%	4,4	19,4	4,2	17,6
IgG _{II}	≅ 43 mg%	5,2	27,1	5,1	26,0
IgG _{III}	≅ 100 mg%	6,8	46,2	6,8	46,2
IgG _{IV}	≅ 191 mg%	9,2	84,6	8,9	79,2
IgA _I	≅ 29 mg%	4,4	19,4	4,05	16,4
IgA _{II}	≅ 58 mg%	4,7	22,1	4,7	22,1
IgA _{III}	≅ 88 mg%	5,5	30,3	5,3	28,1
IgA _{IV}	≅ 175 mg%	6,6	43,6	6,8	46,2
IgA _V	≅ 340 mg%	8,5	72,3	8,9	79,2

Mit diesen Werten wurden wieder die Eichkurven erstellt (Abb. 21).

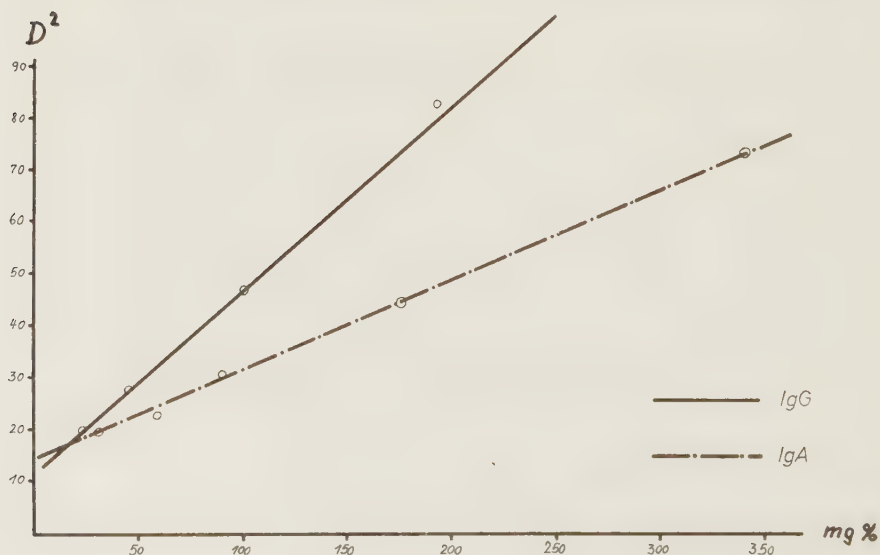


Abb. 21 - Eichkurven zur Bestimmung der IgG- und IgA-Konzentrationen.

b) Die Konzentrationen für IgG in den Fraktionen (in mg%)
 gewonnen aus der Eichkurve der Abb.21 zeigt Tabelle 8 .
 Die Konzentrationen wurden wieder analog C.III.2.b) errechnet.
 Es war

$m = 0,38$				$-c = 12,0$			
Frkt.	D	D ²	Konz.	Frkt.	D	D ²	Konz.
53	4,9	24,0	7,9	95	5,3	28,5	10,6
56	5,2	27,1	9,9	98	4,3	18,5	4,3
59	5,7	32,5	13,8	101	4,5	20,3	5,3
62	4,6	21,2	6,0	104	4,6	21,2	6,0
65	7,2	51,8	26,2	107	4,4	19,4	4,9
71	8,5	72,3	39,6	110	-	-	-
74	9,2	84,6	47,8	113	4,5	20,3	5,3
77	10,3	106,1	61,9	116	4,5	20,3	5,3
80	10,6	112,4	66,0	119	4,5	20,3	5,3
83	10,4	108,2	63,3	122-143	-	-	-
86	9,0	81,0	45,4	146	4,7	22,1	6,6
89	7,2	51,8	26,2	149-170	-	-	-
92	5,5	30,3	12,0				

Tab. 8 - Die IgG-Konzentr. in den Fraktionen.

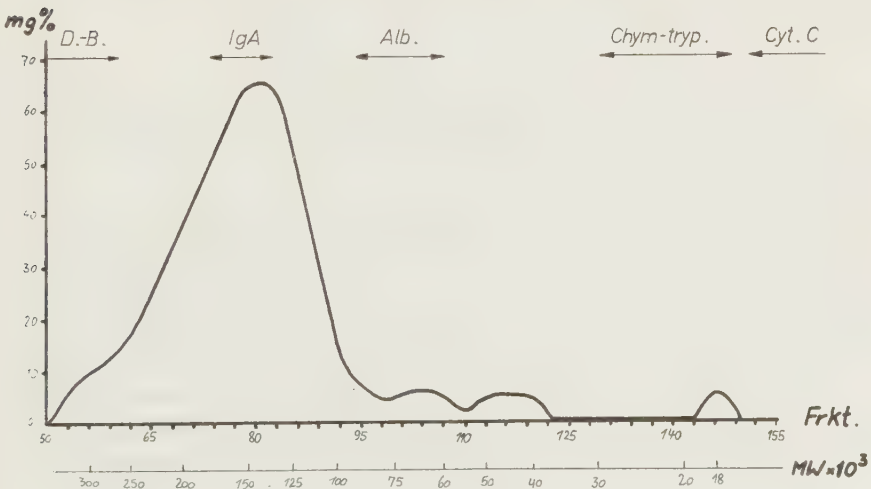


Abb. 22 - IgG-Konzentrationen in den Fraktionen.

Da pro Auftragstelle $4 \times 5 \mu\text{l}$ Probensubstanz eingebracht wurden, mussten auch die aus der Eichkurve erhaltenen Konzentr.-Werte durch 4 dividiert werden. Diese Beträge sind in Tab.8 enthalten und erklären somit die geringeren Werte für gleich-große Hemmkreise, verglichen mit den Eichwerten.

c) Die Konzentrationen für IgA in den Fraktionen (in mg%) berechnet aus Abb.21 enthält Tabelle 9; auch diese wurden gemäß C.III.2.b) bestimmt. Hier ergab sich:

$$m = 0,17 \qquad c = 14,5$$

Frkt.	D	D ²	Konz.	Frkt.	D	D ²	Konz.
56	4,7	22,1	44,7	89	11,1	123,2	639,5
59	4,9	24,0	55,9	92	11,3	127,7	665,8
62	4,0	16,0	8,8	95	12,0	144,0	761,8
65	5,2	27,1	73,7	98	8,3	68,9	319,9
71	5,5	30,3	92,6	101	11,5	132,3	692,6
74	6,6	43,6	170,9	104	10,5	110,3	563,2
77	7,1	50,4	211,2	107	8,9	79,2	380,6
80	8,1	65,6	300,6	110	8,7	75,7	359,9
83	8,5	72,3	339,7	113	4,8	23,1	50,2
86	9,7	94,1	468,2	ab 116	-	-	-

Tab. 9 - IgA-Konzentr. in den Fraktionen.

In Abb.23 sind diese Ergebnisse graphisch dargestellt.

Für IgG waren die Konzentrationen ab Fraktion 53 messbar und lagen am höchsten zwischen Fraktion 60 und 90.

In der graphischen Darstellung dominiert ein breiter Peak, der sich von Fraktion 53 bis etwa Fraktion 95 erstreckt. Das Maximum liegt bei Fraktion 80 (MW 145000) mit ca. 66 mg%. Da im Testlauf auch das IgA-Standard etwa an der gleichen Stelle sein Maximum erreichte (dort Frkt. 79), kann man annehmen, daß die Masse des Peaks, zumindest jedoch der Bereich mit den höheren Konzentrationen, unverändertes IgG darstellt. Die im Anschluß an den großen Peak zwischen den Fraktionen 98 und 119 folgenden IgG-Determinanten wurden mit durchschnittlich 5 mg% gemessen. In diesem Bereich, im MW zwischen 80000 und 40000, konnte bei der ersten Fraktionierung nur ein klei-

ner Gipfel bei MW 59000 von ca. 4 mg% festgestellt werden.

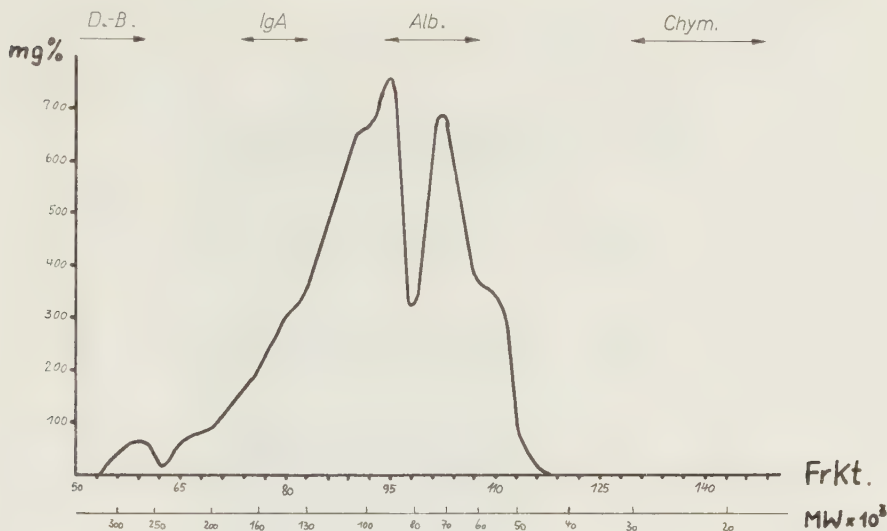


Abb. 23 - IgA-Konzentrationen in den Fraktionen.

Die hier errechneten Konzentrationswerte waren wohl in dieser Größenordnung, sie erstreckten sich aber über einen größeren Bereich. In der qualitativen DID waren diese Moleküle jedoch nur mit A-Fab und A-IgG(H+L) nachzuweisen, und nicht wie hier mit A-IgG.

Bei dieser Untersuchung mit Tri-Partigen-Platten war wie bei der ersten Sputum-Untersuchung bei MW 18000 ein IgG-Fragment nachweisbar. Die ursprünglich sowohl in der DID mit A-IgG, A-Fc und etwas schwächer mit A-Fab (Abb.9) als auch in der RID mit A-IgG (Abb.11) sichtbaren Reaktionen dieses 18000-Fragments waren hier nur mit den Tri-Partigen-Platten für IgG erkennbar, aber nicht in der DID mit den genannten Antisera. Die Konzentrationen dieser Bruchstücke waren jeweils ca. 6 mg%.

Die Konzentrationswerte für IgA lagen allgemein um das 10-fache höher.

Im Frontbereich zeigte sich ein kleiner Peak von Fraktion 53 bis Fraktion 62 mit ca. 55 mg%. Lagen diese Werte noch in der Größenordnung der IgG-Konzentrationen, so stiegen sie ab Fraktion 65 steil an und erreichten zwischen Fraktion 89 und 95 (im MW 107000 bis 89000) ein Maximum mit ca. 760 mg%. Dieser erste Peak in Abb.23 war mit der DID noch in etwa zu bestätigen; dort waren die Präzipitate der Fraktionen 89 und 92 doch nur sehr schwach, Fraktion 95 ergab kein Präzipitat mehr.

Vergleicht man diese Befunde mit dem Ergebnis des Testlaufs, wo IgA-Standard bis ca. MW 125000 erschien, so kann man dieses erste Maximum der Abb.23 als IgA deuten.

In Fraktion 98 (MW 81000) fiel die IgA-Konzentration auf etwa den halben Wert des vorherigen Maximalbetrages ab, und ein zweiter Peak erschien bei Fraktion 101 (MW 74000) bis ca. Fraktion 113 (MW 50000) mit ca. 700 mg%.

Diese Werte für einen MW-Bereich etwa zwischen 80000 und 50000 waren in der DID allerdings nicht zu bestätigen. In der quantitativen Analyse des ersten Ansatzes lagen jedoch vergleichbar große Konzentrationen auch in diesem Abschnitt, dort im MW zwischen 65000 und 39000.

3. Test mit der Immunelektrophorese

Da von den Fraktionsproben nur noch sehr geringe Mengen vorhanden waren, wurden folgende Fraktionen zusammengegeben:

Frakt.	56 - 59,
	68 - 71,
	74 - 77,
	86 - 89,
	104 - 107,
	116 - 119,
	145 - 146, (Frkt. 145 wurde zusätzlich einge-
	engt).

Die Mischung von benachbarten Fraktionen erschien statthaft, da angenommen werden darf, daß sich diese in ihrer Zusammensetzung nur unwesentlich unterscheiden.

Im folgenden wird bei der Angabe der Gemische jeweils die kleinere Zahl genannt.

Das Ergebnis der I.E. einiger Fraktionen zeigt die Abb.24 .
Die I.E. mit A-IgA waren ohne Ausnahme negativ.

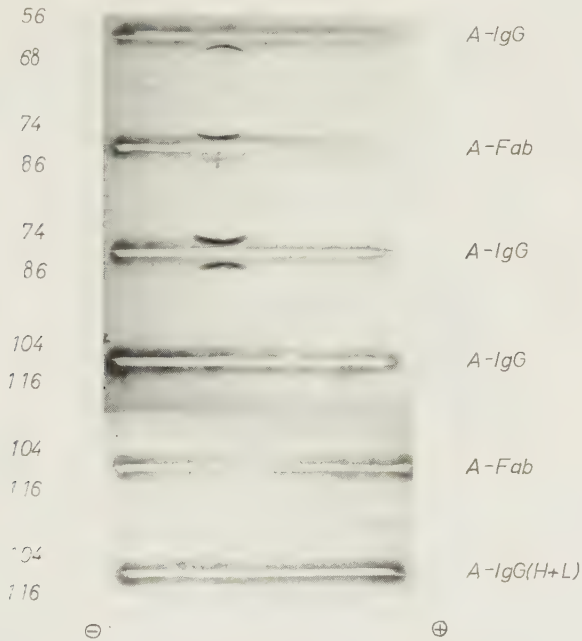


Abb. 24 - I.E. einiger Sputum-Fractionen.
Links neben den Abb. sind die Frakt.-
zahlen angegeben, rechts stehen die
verwendeten Antisera.

Die I.E. der Fraktion 56 (MW ca. 300000) zeigt gegen A-IgG bei geringer elektrophoretischer Wanderung der Proteine ein doppeltes Präzipitat um die Auftragstelle. Fraktion 68 (MW 210000) bildet mit A-IgG dagegen ein einheitliches Präzipitat, zeigt größere elektrophoretische Beweglichkeit, aber keine Doppelbögen. Die Fraktionen 74 (MW 172000) und 86 (MW 118000) wurden parallel gegen A-IgG und gegen A-Fab getestet.

Die Substanzen der Fraktion 74, die in ihrer Molekulargröße den vollständigen Ig entsprechen sollten, zeigten mit A-IgG denn auch ein starkes Präzipitat fast gleichmäßig um die Auftragstelle. Mit A-Fab waren anodenwärts Auffächerungen sichtbar, zur Kathode hin lag eine feine Doppellinie.

Die Ergebnisse bei Fraktion 86 waren denen der Fraktion 74 ähnlich. Mit A-IgG war ein ebenso starkes Präzipitat zu sehen, das jedoch im Vergleich zu Fraktion 74 kathodenwärts abgebaut erschien. Gegen A-Fab zeigte Fraktion 86 ein klar schwächeres und an beiden Enden reduziertes Präzipitat ohne Auffächerung. Die feine, zur Kathode liegende Linie war auch hier erkennbar.

Die Fraktionen 104 (MW 66000) und 116 (MW 46000) wurden mit A-IgG, A-Fab und A-IgG(H+L) getestet.

Mit A-IgG zeigten beide kein Präzipitat.

Mit A-Fab war mit beiden Fraktionen ein feines Präzipitat zu erzielen, mit A-IgG(H+L) waren diese Reaktionen klar intensiver, sie erschienen jedoch beidseitig sehr stark abgebaut.

Die I.E. der Fraktion 145 war mit A-IgG und A-Fab negativ.

Interessant an dieser I.E.-Serie waren die mit A-Fab erzielten Doppellinien und die Spornbildung der Fraktion 74. Da diese Probe im MW-Bereich der natürlichen Ig liegen dürfte, schied bei diesen Erscheinungen eine Spaltung von monomeren IgG aus. Möglicherweise stammen diese Phänomene aber von Fragmenten dimerer bzw. polymerer IgG-Komplexe, die auch Antigen-Determinanten im Fab-Anteil des IgG behielten, und damit mit A-Fab reagieren konnten.

4. Untersuchung auf verschiedene Antigen-Determinanten

Mit der Ouchterlony-Methode analog C.III.4. wurden die unter C.VI.3. angegebenen Fraktionen auf Antigenitäts-Differenzen untersucht. Abb.25 zeigt das Ergebnis.

Keine der Proben zeigte mit den verwendeten Antisera irgendeine Überspornung.

Dieses Resultat hat wohl zwei Ursachen:

Zum ersten lag es wohl daran, daß die Platte mit A-Fab als Antiserum, die im ersten Test Antigenunterschiede zeigte

(Abb.14b), bei diesem Versuch wegen Verwendung verdorbenem Antiserums entfiel. Zum anderen dürften die an ihren Berührungsstellen zum Teil unklar dargestellten Präzipitate auf die nur noch sehr geringen Restmengen der Fraktionsgemische zurückzuführen sein.

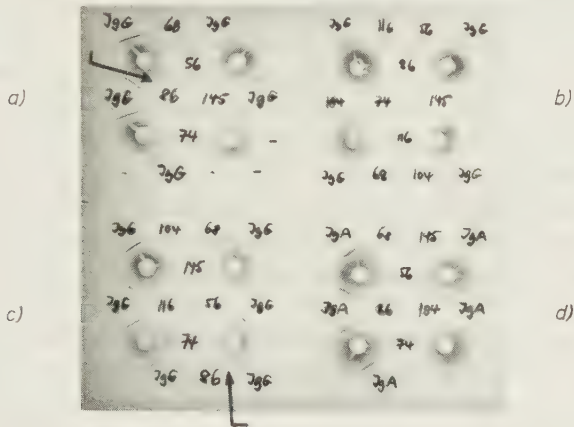


Abb. 25 - Dichterlony-Anordnung zur Bestimmung von Antigen-Determinanten.

Antisera in den zentralen Auftragstellen:

a) A-IgG, b) A-IgG(H+L),

c) A-Fc, d) A-IgA.

Das Ergebnis der I.E. (Abb.24) konnte hier bestätigt und sogar erweitert werden.

Mit A-IgG zeigt Fraktion 86 zwei Präzipitatlinien (Abb.25), in der I.E. war beim entsprechenden Test nur ein starkes Präzipitat aufgetreten. Dieses massive Präzipitat wurde als eine Linie gedeutet, die aber jetzt nach dem qualitativen Test als Doppellinie angesehen werden muß.

Die ebenfalls sehr starke Reaktion von Fraktion 74 mit A-IgG in Abb.24 konnte jedoch nicht als Doppel-Präzipitat interpretiert werden.

Dagegen wurden sowohl mit Fraktion 74 als auch mit Fraktion 86 gegen A-Fc zwei Linien sichtbar (Abb.25c), die völlige Identität zu zeigen scheinen. Ein vergleichbares Ergebnis brachten beide Fraktionen auch in der I.E. der Abb.24 mit A-Fab, wo Doppelbögen erschienen.

D. DISKUSSION

Sputen verschiedener Patienten mit obstruktiven Erkrankungen des Broncho-Pulmonal-Bereichs wurden untersucht auf Ig sowie auf Bruchstücke bzw. Abbauprodukte von Ig.

Das Ausgangsmaterial bestand aus einem Gemisch sämtlicher löslicher Substanzen der lyophilisierten Sputen.

Wie die Abb.4 zeigt, enthielten beide Sputen kein IgM. In verschiedenen Berichten wird dieses Ergebnis bestätigt: In Bronchialsekreten bei Atemwegserkrankungen ist IgM nur in einigen Fällen enthalten (9).

In den weiteren Versuchen wurde daher IgM nicht mehr untersucht. Auch auf die in Bronchialsekreten nur in verschwindend geringen Konzentrationen vorliegenden IgE und IgD wurde verzichtet.

IgA war bei diesem Test des Ausgangsmaterials nur bei einem Sputum nachweisbar, während IgG das klar dominierende Ig zu sein schien.

Zeigte der Ouchterlony-Test des Ausgangsmaterials lediglich die Existenz verschiedener Antigendeterminanten des IgG, so ergab die I.E. (Abb.5) bereits erste Hinweise auf Spalt- oder Abbauprodukte von IgG: Auffächerungen und Doppelbögen ließen veränderte IgG-Moleküle erwarten, wie sie bei Umbau-, Abbau- und Spaltungsvorgängen in typischer Weise entstehen. Zum Nachweis von Verdauungsprodukten war es notwendig, Ig-Fragmente mit kleinerem MW als intakte, vollständige Ig nachzuweisen.

Wie aus den Abb.4 und 5 erkennbar, zeigten beide Patientensputen in der Zusammensetzung der Ig im Prinzip das gleiche Bild. Zur Klärung der Frage, ob in den Sputen Ig-Fragmente vorliegen, erschien es daher statthaft, beide Sputen zu mischen und im folgenden als ein einheitliches Sputum zu betrachten.

Der Nachweis von kleineren Bruchstücken wurde hier nicht nur mit Hilfe der I.E. und dem Vergleich von Antigen-Determinanten geführt, sondern die Fragmente wurden auch nach ihrer Größe getrennt und dann mit den bekannten Methoden dargestellt.

Erst durch die Aufteilung nach dem MW war es möglich, die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsmethoden zu interpretieren und miteinander zu vergleichen.

Sowohl IgG als auch IgA zeigten schon bei einem MW von 300000 klare Präzipitate und Hemmkreise. Da im Testlauf das intakte monomere IgA erst bei einem MW von ca. 190000 erschien, kann es sich bei den schweren Ig also nur um polymere bzw. aggregierte Ig handeln.

Die schweren IgA-Proteine sind in erster Linie S-IgA (MW ca. 390000), die in den externen Körpersekreten das dominierende Ig darstellen (31, 32). Die für dieses S-IgA gemessenen Konzentrationen (Abb.23) erscheinen aber für dieses vorherrschende Ig zu klein. Der Grund hierfür liegt in der Verwendung von Antiserum gegen Serum-IgA, das eine zu geringe Konzentration für S-IgA ergibt, vergleicht man diese mit den Werten, die mit Antisera gegen S-IgA erhalten werden (31).

Die schweren IgG-Moleküle bestehen möglicherweise aus höheren Polymeren, zeigen aber keine Unterschiede zu den Serum-IgG und zu den monomeren IgG (9).

Wie aus den verschiedenen Versuchen zweifelsfrei hervorgeht, sind in dem Sputumgemisch IgG-Fragmente enthalten. Die Proteine sind durch den proteolytischen Angriff zu Bruchstücken verkürzt worden, die in Größenordnungen liegen von kleinen, dialysierbaren Stückchen bis hin zu Fragmenten wenig kleiner als das Ausgangsmaterial.

Am deutlichsten waren Abbauprodukte zu erkennen in einem MW-Bereich zwischen ca. 70000 und 40000, wo beide DID-Ansätze jeweils mit A-Fab und A-IgG(H+L) präzipitierten. Diese Befunde wurden erhärtet durch die entsprechenden RID-Versuche. Dadurch, daß diese Fragmente in beiden Fällen nur mit A-Fab und A-IgG(H+L) sichtbar wurden und zusätzlich auch in der zweiten I.E. (Abb.24), wo je eine Fraktion vom unteren und vom oberen Randbereich des genannten Intervalls nur mit diesen beiden Antisera, nicht aber mit A-IgG, das auch eine Reihe von Fc-Determinanten trägt, reagierte, können diese Bruchstücke dem Fab-Teil des IgG-Moleküls zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Fragmenten um Fab-

Fragmente oder zumindest um Fab-ähnliche Stücke.

Bemerkenswert waren Fragmente mit einem MW von ca. 18000, die in der ersten DID mit A-IgG, A-Fab und A-Fc reagierten und zusätzlich auch in beiden RID-Versuchsreihen mit Werten von ca. 6 mg% auftraten. Sie ließen sich keinem Bereich des IgG-Moleküls zuordnen, da sie von allen Teilen des AK Antigen-Determinanten zu tragen schienen. Da diese Bruchstücke trotz ihrer für die I.E. doch genügend hohen Konzentrationen dort nicht darstellbar waren, mag an einer stark erhöhten elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit liegen, die die Fragmente im Verlauf der I.E. über die Agaroseplatten hinaus wandern ließ.

Ein drittes Intervall war für den Nachweis von Fragmenten von Interesse, nämlich der MW-Bereich von ca. 110000 bis 80000. Obwohl es den Anschein hat, daß die bei der ersten DID bis zu einem MW von ca. 80000 herunter auftretenden Präzipitate dem weitgehend unveränderten IgG entsprechen, deuten doch vier Argumente auf IgG-Bruchstücke hin.

Zum ersten lag der Bereich, in dem beim Testlauf das IgA erschien, zwischen MW 170000 und 125000 und nicht wie hier bis zu einem weit geringerem MW.

Zweitens zeigte die RID des ersten Durchgangs nach einem deutlichem Minimum einem signifikanten Anstieg der IgG-Konzentrationen bei einem MW zwischen ca. 110000 und 95000, woraus ein deutlicher Peak resultierte. Diese Spitze im Kurvenverlauf befindet sich eindeutig hinter dem Bereich, in dem das vollständige Ig bei der Eichung erschien.

Die dritte Tatsache, die auf Fragmente mit einem MW von ca. 100000 schließen ließ, war der Nachweis unterschiedlicher Antigen-Determinanten (Abb.14). Während die Moleküle mit MW 140000 (der Bereich, wo auch das IgA noch im Testlauf auftrat) volle Identität mit dem IgG zeigten, war mit den Proteinen von MW 97000 keine völlige Übereinstimmung der Antigen-Determinanten mehr zu erkennen (Abb.14). Das Fehlen eines Teils des ursprünglichen Moleküls mit Verlust einer Anzahl Antigen-Determinanten war der Grund, weshalb diese Substanzen vom IgG-Präzipitat überspornt wurden.

Schließlich zeigte die zweite Serie zur Bestimmung von Anti-

genitäts-Unterschieden bei Fragmenten mit einem MW von ca. 118000 sowohl mit A-IgG als auch mit A-Fc Doppelpräzipitate (Abb.25 ). Diese Doppellinien beweisen die Existenz zweier immunolog. verschiedener Bruchstücke; dieselben Fragmente zeigten in der zweiten I.E.-Serie (Abb.24) diese Doppellinien, hier jedoch mit A-Fab.

Diese Doppelpräzipitate sind erklärbar, waren doch in den verwendeten Sputen eine ganze Reihe von Proteasen mit keineswegs gleicher Spezifität enthalten, die durchaus in der Lage sind, die heterogenen IgG-Moleküle an unterschiedlichen Stellen zu den genannten Bruchstücken abzubauen.

Fragmente dieser Größenordnung sind in der Literatur sowohl von normalem menschlichem IgG (21) als auch von menschlichen IgG-Myelom-Proteinen (22) beschrieben:

F(c)₂ und F(ab)₂ (gebildet aus IgG2 und IgG4), Fab/c aus IgG1 (ein Fab- und ein Fc-Fragment gebunden durch eine ungespaltene H-Kette) und Fch (ein Fragment aus IgG3, bestehend aus dem Fc-Teil und einer besonders erweiterten Hinge-Region) entstehen bei der Verdauung mit Papain unter verschiedenen Bedingungen. Das mit Pepsin gebildete F(ab)₂ zeigt etwa das gleiche MW.

Die meisten dieser Bruchstücke mit einem MW von ca. 100000 sind im Bereich um die Hinge-Region angegriffen, wo sich eine extrem offene Struktur zu befinden scheint (24).

Daß die in dieser Zone proteolytisch gespaltenen IgG-AK nicht in zwei Fab- und ein Fc-Teil zerfallen, sondern der Abbau bereits vorher gestoppt wird, hat nach MICHAELSEN und NATVIG möglicherweise folgende Ursache (21):

Die Hydrolyse von Peptid-Bindungen in einer der H-Ketten induziert Änderungen der gesamten Tertiär- und Quartär-Struktur, was in einer Resistenz gegen Proteolyse auf der anderen H-Kette resultiert.

Aus diesen Überlegungen läßt sich jedoch nicht ableiten, daß es sich bei den hier gefundenen Bruchstücken ebenfalls um die gleichen Fragmente handeln muß. Da auch mit anderen Proteasen wie beispielsweise Kathepsin, einer auch in Sputum vorliegenden Gewebe-Protease, ähnliche Fragmente des IgG entstehen (36), ist es durchaus denkbar, daß zumindest ähnlich ge-

staltete Bruchstücke auch in Sputum anzutreffen sind.

Es war auszuschließen, daß die nachgewiesenen Fragmente direkt aus dem Serum in den Bronchialbereich gelangt sind, ohne daß sich ein lokales Geschehen abgespielt hätte.

Das hierfür getestete Serum eines gesunden Menschen ergab in der DID bis zu einem MW von ca. 94000 Präzipitate, im niedrigeren MW-Bereich war kein Fragment nachweisbar.

Dieser Befund, daß IgG-Determinanten bis zu einem für intakte IgG zu niedrigem MW sichtbar waren, ist möglicherweise auf einen "Überladungseffekt" der Säule zurückzuführen, denn durch die Verdünnung des Serums auf das 2,5-fache war die IgG-Verteilung bereits zu Beginn der Chromatographie über einen zu breiten Gelstreifen vorangeschritten, um sich nicht im Verlauf der Säulenpassage bis zu der genannten Marke zu "verschmieren".

Daß es sich hier bei der Serum-DID um die vorher beschriebenen großen IgG-Fragmente handelt, ist nicht wahrscheinlich, da im Serum keine kleineren Fragmente erschienen. Bei Auftreten der Riesenfragmente aber wäre notwendigerweise auch die Existenz der kleinen Bruchstücke mit ca. 50000 MW nachzuweisen, die beim Abbau des IgG zu den schweren Fragmenten zumindest teilweise anfallen.

Für IgA war der Nachweis von Fragmenten nicht im selben Maße eindeutig wie für IgG. Beide DID-Ansätze ergaben keinen Hinweis auf Spaltprodukte und auch die I.E. ließen keine Bruchstücke annehmen.

In den beiden quantitativen Analysen jedoch schienen Fragmente vorzuliegen in einem MW-Bereich zwischen 75000 und 50000. Diese Größenordnung deckt sich in etwa mit dem Ergebnis bei IgG; eine genauere Zuordnung ließ sich jedoch nicht vornehmen, da spezifische Antisera gegen definierte IgA-Fragmente nicht zur Verfügung standen.

Daß sich für IgA nicht ebenso eindeutige Bruchstücke wie für IgG zeigen ließen, ist zurückzuführen auf die erhöhte Resistenz der S-IgA gegen Proteolyse (3, 31, 32). Die in Sekreten neben dem dominierenden S-IgA in geringeren Konzentrationen auftretenden monomeren IgA zeigen diese Resistenz jedoch nicht,

sodaß die in den beiden RID-Versuchsreihen sichtbaren Präzipitate im MW-Bereich zwischen 75000 und 50000 von diesen leicht verdaubaren 7S-IgA stammen könnten.

In manchen Veröffentlichungen ist darauf hingewiesen worden, daß es im Verlauf verschiedener obstruktiver Erkrankungen des Broncho-Pulmonal-Systems zu Entzündungserscheinungen kommt, die vom immunolog. Standpunkt aus nicht zu erklären seien, da in den Bronchialsekreten und Sputen genügend Ig vorliegen würden (8).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit besteht ein Großteil dieser AK jedoch aus mehr oder weniger stark abgebauten Ig, deren Fähigkeit, antigenes Material zu binden oder zu neutralisieren, nicht schlüssig beantwortet werden kann.

Zu den diskutierten Fragmenten kann es kommen, wenn auf Entzündungsreize hin von Leukozyten, Makrophagen, Bakterien oder Gewebszellen Proteasen im Überschuss freigesetzt werden und einen massiven Verbrauch der schützenden Inhibitoren bewirken. Hält dieser Entzündungsreiz über eine längere Zeit an, so entwickelt sich allmählich ein Mißverhältnis zwischen anfallenden Proteasen und verfügbaren Proteasen-Inhibitoren, sodaß das Übergewicht an proteolytischen Enzymen jetzt zum Abbau bzw. zur Spaltung der Ig führt.

Man kann somit annehmen, daß auch die Ig am Schutz der Inhibitoren gegen proteolytische Aktivität profitieren, oder anders ausgedrückt:

Die alleinige Präsenz und Verfügbarkeit von AK schützt den Organismus nicht mit Sicherheit vor einer Infektion oder Krankheit. Die Ig, die Mediatoren der Infektabwehr, bedürfen zu ihrer effektiven Funktion vielmehr selbst eines Schutzes, der u.a. auch von Proteasen-Inhibitoren gewährleistet wird.

E. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Versuchsübersicht

Untersucht auf Ig und mögliche Ig-Fragmente wurde ein Gemisch der serösen Phasen von lyophilisierten Sputen mehrerer Patienten mit verschiedenen obstruktiven Lungenerkrankungen. Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile wurde das Probengemisch durch Gelfiltration in Sephadex G-200 aufgetrennt, in gleiche Volumina fraktioniert und jede dritte Fraktion bis zur Trockne eingeengt.

Die konzentrierten Fraktionen wurden in gleichen Mengen physiologischer NaCl aufgeschwemmt und im Mancini-Test, mit der Ouchterlony-Methode, der Immunelektrophorese und auf verschiedene Antigen-Determinanten ausgewertet.

Zur Bestimmung der MW wurde die gleiche Säule mit mehreren Substanzen bekanntem MWs geeicht.

Zum Vergleich der Ig-Verteilung und Ig-Anteile im Sputum und Normalserum wurde in der gleichen Säule das Serum eines gesunden Menschen chromatographiert, jede dritte Fraktion konzentriert und qualitativ mit dem Ouchterlony-Test ausgewertet.

II. Materialien und Methoden

1. Probenauswahl

Zur Untersuchung auf Ig und Ig-Fragmente wurde ein Gemisch der serösen Phasen lyophilisierter Sputen mehrerer Patienten mit nicht genauer unterschiedenen Lungenobstruktionen verwendet. Die Sputen waren bereits vorher in eine seröse und in eine muköse Fraktion geteilt und lyophilisiert.

2. Aufbereitung der Proben

1,2 bzw. 1,0 Gramm des gefriergetrockneten Materials wurden in ein Zentrifugenglas mit 12 ml Säulenpuffer gegeben und zur besseren Lösung der Proteine 15 Minuten lang auf einem Magnetrührer gemischt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 3800 U/min. wurde der Überstand entnommen und auf die Säule aufgetragen.

3. Säulenchromatographie mit Sephadex G-200 (2)

a) Sputum-Fraktionierung

12 ml der Sputumlösung werden auf die Säule aufgetragen und wie unter 3d beschrieben fraktioniert. Der Schreiber liefert die Verteilungskurve der Proteine, die MW lassen sich wie unter 3f beschrieben für jede Fraktion berechnen.

b) Prinzip der Säulenchromatographie

Sephadex ist ein modifiziertes Dextran, dessen Polysaccharid-Ketten im gequollenem Zustand zu einem dreidimensionalen Gitter vernetzt sind. Mit einem geeigneten Fließmittel bietet Sephadex als Säulenfüllung in dieser Gelform die Möglichkeit, verschiedene Moleküle aufgrund ihrer Größe zu trennen.

Moleküle, größer als die größten Poren in der Oberfläche eines Sephadex-Kügelchens, können in die Gelpartikel nicht eindringen und verbleiben in der flüssigen Phase, während kleinere Moleküle entsprechend ihrer Größe und Form in die Gelpartikel eindringen können.

Größere Moleküle werden demnach überhaupt nicht oder nur wenig gebremst und fallen durch das Gel hindurch, während kleinere Moleküle sich mehr und mehr verfangen. Auf diese Weise erscheinen die schwersten Moleküle zuerst im Eluat, die leichteren später.

Die Säulenchromatographie mit Sephadex entspricht somit einem "umgekehrtem Sieb".

c) Reagentien und Geräte

Sephadex G-200 (für MW von ca. 10000 bis 300000)

Borat-Puffer: 0,05m Natrium-tetra-Borat

0,2m NaCl pH 8,0

0,002% Natrium-Azid

Säule mit Puffer-Reservoir, Verschluß, Zuführschläuche, Fraktomat und Schreiber.

d) Methodik

Der gequollene Sephadex wird mit Puffer zu einer leicht gießbaren Suspension verdünnt und in die senkrecht stehende Säule eingefüllt. Der Sephadex setzt sich ab und der Überstand an Puffer wird entfernt. Zur Füllung der Säule muß mehrmals nachgegossen werden.

Zum Äquilibrieren wird die Säule für etwa 24 Stunden mit dem Fließmittel gespült.

Vor dem Auftragen der Analysen wird die Oberfläche der Gel-Säule mit einem Filterpapier abgedeckt, damit beim Auftragen der Proben die obere Sephadexschicht nicht aufgewirbelt wird. Mit einer Pipette wird die Analyse auf das gerade noch feuchte Filterpapier vorsichtig aufgetragen und der Säulenauslauf geöffnet. Sobald die Probensubstanz in die Gelfüllung einge-zogen ist, wird an der Auftragstelle mit einer kleinen Menge Puffer nachgewaschen und nach völligem Einsickern das Puffer-Reservoir zur Gelfiltration angeschlossen. Abschließend werden Fraktomat und Schreiber eingestellt und angeschlossen.

e) Eichung der Säule zur MW-Bestimmung

Zur Eichung wurden folgende Substanzen verwendet:

Dextran-Blau	MW	2.000.000
IgA-Standard (Behringwerke)	MW	160000
Rinder-Albumin	MW	68000
Chymotrypsinogen	MW	23000
Cytochrom C	MW	13000

Eine Eichung der Säule ist notwendig, will man die Sputum-Fraktionen ihrem MW zuordnen. Durch Messung der Eluatsvolumina der Testsubstanzen erhält man Relationswerte von Volumen zu MW, die eine Zuordnung von Sputumfraktion und deren MW erlauben.

f) Aufstellen der Eichkurve

Nach Gelfiltration der Testsubstanzen erhält man vom Schreiber eine Kurve mit je einem Peak pro Testsubstanz. Der Schreiber zeichnet die Kurven abwechselnd in zwei Farben, nach jeder Fraktion wechselnd. Das jeweilige Eluatsvolumen wurde in

einem Standzylinder auf 1 ml genau bestimmt, indem die Fraktionsvolumina bis zum Maximum des jeweiligen Peaks zusammengeschüttet wurden. Die Eichkurve erhält man, indem man auf halblogarithmischem Millimeterpapier dem logarithmisch aufgetragenen MW (Abszisse) die errechneten K_{av} -Werte bzw. den Quotienten $\frac{v_e}{v_o}$ zuordnet.

Für K_{av} gilt:

$$K_{av} = \frac{v_e - v_o}{v_t - v_o}$$

Dabei ist: v_e = jeweiliges Eluatvolumen der Fraktion
 v_o = äußeres Volumen der Säule; es entspricht dem Eluatvolumen von Dextran-Blau, das "ungebremst" durch die Gelsäule "fällt"
 v_t = totes Volumen der Gelsäule = $r^2 \times \text{Länge}$.

4. Konzentrierung der fraktionierten Proteine

Die im fraktionierten Eluat vorliegenden Proteine wurden entsalzt und eingeeengt nach folgenden Methoden:

a) Sartorius Kollodiumhülsen:

Jeweils eine Fraktion wurde in eine Kollodiumhülse umgefüllt und durch Druckdialyse an einer Wasserstrahlpumpe bis zur Trockenheit eingeeengt.

b) Gefrieretrocknung:

Jeweils eine Fraktion wurde in ca. 10 cm langen Dialysesschläuchen ($\emptyset$ 2,5 cm) im fließenden Leitungswasser für ca. 30 Stunden dialysiert, in dicken Reagensgläsern eingefroren und gefrieretrocknet.

Die Trockensubstanzen nach beiden Methoden wurden jeweils in 0,15 ml physiol. NaCl gelöst und in Minireagensgläschen bei ca. 4° C aufbewahrt.

5. Zwei-dimens. Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony (25)

Diese Methode ist zum Vergleich verschiedener Antigenlösungen und zur qualitativen Analyse besonders geeignet.

a) Prinzip

Das Prinzip dieser Methode ist die Doppeldiffusion zweier Lösungen in einer Ebene, wobei Antigen und AK aus verschie-

denen Reservoirs in einem inerten Gel gegeneinander diffundieren. Beim Zusammentreffen von Antigen und AK bildet sich ein linienförmiges Präzipitat.

b) Reagentien und Geräte

- Agarose (Behringwerke)
- Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer (Veronal-Puffer)
- Na-Azid
- H₂O dest.
- spezif. Antisera gegen Human-Ig v. Kaninchen (Behringw.)
- Objektträger
- Nivelliertisch, Stanzen
- Hamilton-Mikroliterpipette.

c) Methodik

2 g Agarose und 20 mg Na-Azid werden in 100 ml dest. Wasser bis zur Bildung einer klaren Lösung im siedenden Wasserbad erhitzt. In ein kleines Reagensglas gibt man 1,5 ml Veronal-Puffer, mischt mit 1,5 ml der heißen Agaroselösung (das Gel hat nun eine Konzentration von 1%) und gießt das Gemisch langsam auf einem vorher mit Chromschwefelsäure gereinigten Objektträger (7,6x2,6 cm). Um eine gleichmäßig dicke Gelschicht zu erhalten, liegen die Glasplatten auf einem Nivelliertisch völlig waagrecht.

Nach Erstarren der Agarose werden die Löcher für Antigen und AK mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Stanze ausgehoben.

Die Anordnung der Auftragstellen entspricht einem regulärem Sechseck mit einem zentralen Loch für das Antiserum.

Das Einbringen der Analysen erfolgt mit Hamilton-Mikroliter-Pipetten (Nr. 7005 N bzw. 701 N).

In die zentrale Auftragstelle werden 8 µl des jeweiligen Antiseraums eingefüllt und in die 6 konzentrisch um das Zentrum angeordneten Löcher jeweils 6 µl der zu testenden Proben. Der Diffusionsvorgang erfolgt während 24 Stunden in einer feuchten Kammer.

Die Agaroseplättchen mit den Immunpräzipitaten werden hierauf für ca. 48 Stunden unter mehrmaligem Wechseln der Flüssigkeit

in physiolog. NaCl-Lösung gewaschen, um das Überschüssige, nicht präzipitierte Protein aus dem Gel zu entfernen. Die Platten werden mit Filterpapier und Zellstoff bedeckt, unter Druck gepresst und im warmen Luftstrom endgültig getrocknet. Das Anfärben der Präzipitate erfolgt für ca. 20 Minuten in folgendem Färbebad:

5 g Coomassie-Blue in
450 ml Äthanol
450 ml dest. Wasser
100 ml Eisessig.

Das Entfärben der gepressten Platten erfolgt mit einer Entfärbelösung gleicher Zusammensetzung, lediglich ohne Coomassie. Die Auswertung erfolgt rein qualitativ.

6. Einfache radiale Immundiffusion nach Mancini (17)

Die radiale Immundiffusion nach Mancini, Carbonara und Heremans erlaubt bezüglich eines definierten Bezugssystems die quantitative Antigenbestimmung aus einem spezifischem Immunpräzipitat.

a) Prinzip

Das Prinzip besteht darin, daß die gelösten Moleküle eines definierten Antigens von einer runden Gelaussparung aus radial (= zwei-dimensional) in ein homogenes, gleichmäßig dickes und mit dem korrespondierendem AK vermisches Gel diffundieren. Infolge des Kontaktes von Antigen und AK bildet sich eine kreisförmige (zylindrische) unlösliche Präzipitationszone, deren Kreisfläche einschließlich der Auftragstelle der eingesetzten Antigenmenge direkt proportional ist.

Nach "optimaler Diffusionszeit" ist das Ergebnis abzulesen. Diese optimale Diffusionszeit ist dann erreicht, wenn die vorgegebenen Antigenmoleküle alle zur Verfügung stehenden AK im Bereich der Äquivalenzzone zu ihrer Bindung gezwungen hat. Von diesem Zeitpunkt an kommt es zu keiner weiteren Vergrößerung des Präzipitatkreises: Es handelt sich hier um eine Endpunkt-Diffusion.

b) Reagentien und Geräte

- Partigen-Platten (antiserumhaltige Agarplatten in feuchter Kammer), Behringwerke Marburg
- Standard-Ig, Behringwerke
- Nivelliertisch
- Hamilton Mikroliter-Pipette
- Mess-Schablone (auf 0,1 mm genau)
- Betrachtungskästchen für Partigenplatten
- Millimeterpapier.

c) Methodik

Die Platten bleiben bei Zimmertemperatur ca. 5 Minuten geöffnet, um Kondenswasser restlos aus den Auftragstellen zu entfernen. In die Auftragstellen 1-3 werden mit der Hamilton-Spritze gleiche Mengen der Standard-Ig mit bekannten Konzentrationen eingefüllt. Die Auftragstellen 4-12 werden mit gleichen Volumina der zu untersuchenden Analysen-Lösungen gefüllt. Die Platten bleiben auf horizontaler Unterlage (Nivelliertisch) verschlossen bis die Präzipitat-Bildung abgeschlossen ist.

Das Ergebnis läßt sich nach optimaler Diffusionszeit ablesen.

d) Auswerten nach Aufstellen einer Bezugskurve

Die Auswertung erfolgt für jedes Ig getrennt in einer eigenen Bezugskurve auf linearem Millimeterpapier.

Trägt man auf der Abszisse die Antigen-Konzentration und auf der Ordinate die quadrierten Durchmesser der Präzipitatkreise der Standardlösungen als Funktion der bekannten Konzentrationen auf, so ergibt sich eine Gerade, die die Ordinate im allgemeinen zwischen 8,5 und 13,5 (mm^2) schneiden soll.

Zur Bestimmung der Analysenkonzentrationen werden die um jede Auftragstelle entstandenen Präzipitatkreise ausgemessen und zu den quadrierten Durchmessern die zugehörigen Ig-Konzentrationen abgelesen.

7. Immunelektrophorese (10, 28)

a) Prinzip

Die von Grabar und Williams 1953 entwickelte Methode der Immunelektrophorese stellt die Kombination eines physikalischen und eines immunchemischen Untersuchungsverfahrens dar. Im Agarosegel werden zunächst die Proteingemische im elektrischen Feld nach ihrer Ladung aufgetrennt, und dann der Einwirkung eines präzipitierenden Antiserums ausgesetzt. Dies geschieht in der Weise, daß man das in eine Rinne in der Agarose eingefüllte Antiserum gegen die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine diffundieren läßt. Beim Zusammentreffen mit den spezifischen Antigenen bilden sich im Agar gut erkennbare Präzipitate.

In dieser Arbeit wurde die materialsparende Mikromethode der Immunelektrophorese nach Scheidegger verwendet.

b) Reagentien und Geräte

- Objektträger (76 x 26 mm)
- Agarose (Behringwerke)
- Diäthyl-Barbiturat-Puffer (Veronal-Puffer), pH 8,6
- Na-Azid
- spezif. Antisera gegen Human-Ig (Behringwerke)
- Boskamp-Elektrophorese-Apparatur mit Zubehör
- Filterpapier (Schleicher und Schüll)

c) Methodik

Das Herstellen der Mikroplatten mit Agarose wurde bereits unter II.5.c) beschrieben.

Zum Unterschied der Anordnung nach Duchterlony wird hier das Antiserum erst nach der Auftrennung in eine Rinne gegeben. Pro Platte lassen sich zwei verschiedene Antigengemische untersuchen.

Soll eine Antigenlösung direkt mit einem bekanntem, definierten Protein oder einem Gemisch verglichen werden (Human-Standard-Serum, Ig-Standard), kann in der zweiten Auftragsstelle ein solches als Kontroll- oder Standard-Wert verglichen werden.

Zunächst werden gleiche Mengen Puffer (7b) und Aqua dest. gemischt ($\hat{=}$ gleiche Pufferkonzentration wie in den Agarose-Platten) und damit die beiden Tröge der Elektrophoresekammer gleichmäßig gefüllt.

In die beiden Auftragstellen werden jeweils 5 μ l der zu untersuchenden Analysen eingefüllt und auf einem wassergekühltem Steg zwischen beiden Puffertrögen waagrecht nebeneinander angeordnet. Der Kontakt zum Elektrophoresepuffer wird hergestellt durch angefeuchtete Filterpapierstreifen, die an den Agaroseschichten auf beiden Seiten fest anliegen. Die Spannung der Elektrophorese beträgt 170 Volt gemessen an beiden Elektroden, das entspricht einer Spannung von 45 Volt oder einer Feldstärke von 6 Volt/cm gemessen an den Enden der Agaroseplatten. Die Auftrennung der Proteine erfolgt während 60 bis 90 Minuten.

Nach der Auftrennung wird die Agarose aus der vorgestanzten Rinne mit einer Nadel herausgehoben und ca. 100 μ l Antiserum mit einer Mikroliter-Pipette eingefüllt.

Zur Bildung des Immunpräzipitates werden die Plättchen für ca. 30 Stunden in einer feuchten Kammer möglichst waagrecht gelagert.

Waschen, Pressen, Färben und Entfärben erfolgt wie unter II.5.c beschrieben.

8 Nachweis verschiedener Antigen-Determinanten im Ouchterlony-Test

a) Prinzip

Das Prinzip ist das gleiche wie bei der qualitativen Ouchterlony-Methode (siehe II.5.a). Diese Methode ist zum Vergleich verschiedener Antigendeterminanten besonders geeignet.

Es bilden sich linienförmige Präzipitate, die sich schneiden, überlappen oder ineinander übergehen können.

Dabei bedeuten:

- Fusion zweier benachbarter Präzipitatlinien:
Identität der Substanzen;

- Spornbildung zweier benachbarter Präzipitatlinien:
Reaktion der partiellen Identität, wobei das immunolog.
defiziente Ig überlappt wird;
- Überkreuzung zweier benachbarter Präzipitatlinien:
Nachweis der Nichtidentität.

b) Reagentien und Geräte siehe II.5.b)

c) Methodik siehe II.5.c)

F. ZUSAMMENFASSUNG

Sputen mehrerer Patienten mit chron. obstruktiven Bronchialerkrankungen wurden untersucht auf Ig und Ig-Fragmente. Das lyophilisierte Sputum wurde gelöst, zentrifugiert und der Überstand in Sephadex G-200 chromatographiert. Die nun nach dem MW getrennten Proteine wurden nach folgenden Methoden untersucht: a) der qualitativen DID nach Ouchterlony, b) der quantitativen RID nach Mancini, c) der I.E. und d) auf Antigenitätsunterschiede nach der Ouchterlony-Methode. In einem Parallelversuch wurde Serum eines Gesunden in der gleichen Weise wie die Sputumproteine aufgetrennt und mit der DID auf Ig und eventuelle Ig-Fragmente analysiert.

Durch Vergleich der Ergebnisse wurde gezeigt, daß in den untersuchten Sputen mindestens drei verschiedene IgG-Fragmente vorliegen, die in MW-Bereichen liegen von

- 1) ca. 110000 bis 80000,
- 2) ca. 70000 bis 40000 und
- 3) ca. 18000.

Für IgA waren Bruchstücke nicht im gleichen Maße eindeutig zu beweisen wie für IgG. Lediglich in den RID-Versuchen mit Partigenplatten erschienen Fragmente des IgA und hier auch nur in einem MW-Bereich zwischen 75000 und 50000.

Die anderen Ig-Klassen wurden nicht untersucht.

Ein Großteil der AK in Sputen bei chron. obstruktiven Bronchialerkrankungen besteht somit aus mehr oder weniger stark abgebauten Ig, deren Fähigkeit, antigenes Material zu binden oder zu neutralisieren, nicht mit Sicherheit beurteilt werden kann.

Zu den Fragmenten kann es kommen, wenn als Reaktion auf Entzündungsreize über eine längere Zeit von Leukozyten, Bakterien oder Gewebezellen Proteasen im Überschuß freigesetzt werden. Durch massiven Verbrauch an schützenden Inhibitoren, deren Produktionsrate mit der Proteasen-Entwicklung nicht mithalten kann, entwickelt sich allmählich ein Übergewicht an proteolytischen Enzymen, das jetzt zur Spaltung der Ig führt.

G. LITERATUR

- (1) ADLERSBERG J.B., E.C.FRANKLIN, B.FRANGIONE :
Repetitive hinge region sequences in human IgG3:
Isolation of an 11.000 dalton fragment.
Proc.Nat.Ac.Sci. 72 : 723 (1975)
- (2) ANDREW P. :
Estimation of the molecular weights of proteins
by Sephadex gel filtration.
Biochem.J. 91 : 222 (1964)
- (3) BLOTH B. :
Purification, antibody activity and ultrastructure
of secretory and highpolymer IgA.
Acta pathol.microbiol.scand. 78B : 877 (1970)
- (4) BRANDTZAEG P. :
Structure, synthesis and external transfer of mucosal Ig.
Annales d'immunol. 124C : 417 (1973)
- (5) EDBERG S.C., P.M.BRONSON, van OSS C.J. :
The valency of IgM and IgG rabbit antidextran anti-
body as a function of the size of the dextran-molecule.
Immunochem. 9 : 273 (1972)
- (6) van EYK H.G. :
Fragmentation of human Ig with papain.
Biochim.biophys.Acta 127 : 241 (1966)
- (7) FRANGIONE B., C.MILSTEIN, J.R.L.PINK :
Structural studies on IgG.
Nature 221 : 145 (1969)
- (8) GOETZ H. :
Immunochem. Untersuchungen an Sputumproteinen und der
Bronchialschleimhaut vor und nach Sekretolyse.
Zeitung f. Immunforschung 140 : 272 (1970)

- (9) GOETZ H. :
Immunol. aspects of bronchial secretions.
Scand.J.Respir.Diseases 90 : 17 (1974)

- (10) GRABAR P. :
Immunelectrophoresis.
Meth.biochem.Anal. 7 : 1 (1959)

- (11) HADDING U., D.BITTER-SUERMAN :
Das Komplementsystem und seine Funktion.
Deutsches Ärzteblatt 13 : 932 (1974)

- (12) HEIMER R., S.S.SCHNOLL, A.PRIMACK :
Products of the peptic digestion of human gamma-G Ig.
Biochemistry 6 : 127 (1967)

- (13) HOCHSTRASSER K., R.REICHERT, S.SCHWARZ, E.WERLE :
Isolierung und Charakterisierung eines Proteasen-
Inhibitors aus menschlichem Bronchialsekret.
Zeit.physiol.Chem. 353 : 221 (1972)

- (14) HOCHSTRASSER K., R.REICHERT, E.WERLE, H.HAENDLE :
New proteinase inhibitors in the secretions of some
mucous membrans of the human body.
Prot.Biol.Fluids XX, Brugge (1972)

- (15) HOCHSTRASSER K., R.REICHERT, S.SCHWARZ, E.WERLE :
Detection and isolation of a second stable proteinase
inhibitor from human bronchial mucous.
Zeit.physiol.Chem. 354 : 923 (1973)

- (16) JEFFERIS R., P.D.WESTON, D.R.STANWORTH :
Relationship between the papain sensitivity of human
IgG and their H-chain subclasses.
Nature 219 : 646 (1968)

- (17) MANCINI G., A.O.CARBONARA, J.F.HEREMANS :
Radial immunodiffusion.
Immunochem. 2 : 235 (1965)
- (18) McLENNAN J.C.M., G.E.CONNELL, F.M.GOTCH :
Effector activating determinants on IgG.
II. Differentiations of the combining sites for C1q
from those for cytotoxic K-cells and neutrophils by
plasmin digestion of rabbit IgG.
Immunology 26 : 303 (1974)
- (19) MESTECKY J., R.E.SCHROHENLOHER, R.KULHAVY :
Site of J-chain attachment to human polymeric IgA.
Proc.Nat.Ac.Sci.US 71 : 544 (1974)
- (20) MICHAELSEN T.E., J.B.NATVIG :
The hinge region of IgG3, an extended part of the
molecule.
FEBS-Letters 28 : 121 (1972)
- (21) MICHAELSEN T.E., J.B.NATVIG :
Three new fragments F(ab)₂, F(c)₂, and Fab/c obtained
by papain proteolysis of normal human IgG.
Scand.J.Immunol. 1 : 255 (1972)
- (22) MICHAELSEN T.E., J.B.NATVIG :
Characterization of subclass-related F(ab)₂, Fab/c,
and Fch fragments obtained by short papain digestion
of human IgG myeloma proteins.
Scand.J.Immunol. 2 : 299 (1973)
- (23) MORRISON S.L., M.E.KOSHLAND :
Characterization of the J-chain from polymeric Ig.
Proc.Nat.Ac.Sci.US 69 : 124 (1972)

- (24) NATVIG J.B., H.G.KUNKEL :
Human Ig: Classes, subclasses, genetic variants,
and idiotypes.
Advanc.Immunol. 16 : 1 (1973)

- (25) DUCHTERLONY Ö. :
Geldiffusion for immunological analysis.
Prog.Allergy 5 : 1 (1958)

- (26) PARKHOUSE R.M.E., E.DELLA CORTE :
Biosynthesis of IgA and IgM.
Control of polymerization by J-chain.
Biochem.J. 136 : 607 (1973)

- (27) PORTER R.R. :
The hydrolysis of rabbit gamma-globulin and
antibodies with crystalline papain.
Biochem.J. 73 : 119 (1959)

- (28) SCHEIDEGGER L. :
Une micromethode de l'immuno-electrophorese.
Int.Arch.Allergy 7 : 103 (1955)

- (29) TAGER J., F.E.SPEIZER :
Role of infection in chronic bronchitis.
New Engl.J.Med. 292 : 563 (1975)

- (30) THRASHER S., P.E.Bigazzi, T.YOSHIDA, S.COHEN :
Effect of fluorescein conjugation on Fc-dependent
properties of rabbit antibody.
J.Immunol. 114 : 762 (1975)

- (31) TOMASI T.B.Jr., J.BIENENSTOCK :
Secretory immunoglobulins.
Adv.Immunol. 9 : 1 (1968)

- (32) UNDERDOWN B.J. :
Das secretorische Immunsystem.
(Ig in Sekreten und bei Allergosen).
Klinikerzt Heft 5 : 7 (1973)
- (33) UNDERDOWN B.J. :
Is secretory component disulfid-bonded to both
monomer subunits in human secretory IgA dimer?
Biochem.biophys.Res.Comm. 62 : 54 (1975)
- (34) WEEKE B. :
Storage of human serum for immunochemical
determination of the serum proteins.
Prot.Biol.Fluids 19 : 547 (1971)
- (35) WILSON D. :
Studies on the opsonic activity of human secretory
IgA using an in vitro phagocytosis system.
J.Immunol. 108 : 726 (1972)
- (36) WOLFENSTEIN-TODEL C., B.FRANGIONE, E.C.FRANKLIN :
Partial amino acid sequences of an IgA2 human Ig
heavy chain.
Biochim.biophys.Acta 379 : 627 (1975)

Herrn Professor Dr. Naumann danke ich für die guten Arbeitsbedingungen.

Für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, im biochemischen Labor freizügig zu arbeiten, sowie für die jederzeit gewährte freundliche Beratung und Unterstützung, die er für seinen Doktoranden übrig hatte, möchte ich Herrn Professor Dr. Hochstraßer herzlich danken.

Herrn Priv.-Dozent Dr. Bretzel, Frau Heindl und Frl. Lempart danke ich für die zahlreichen Tips und Anregungen bei der Durchführung der Versuche.

L E B E N S L A U F

Am 5.8.1946 wurde ich, Friedrich Burgert, als erstes Kind des Willi Burgert und seiner Ehefrau Anna in Würzburg geboren.

Von 1952 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Albertshausen bei Würzburg und trat im September 1957 in die Oberrealschule Würzburg ein. Durch Wohnungswechsel bedingt besuchte ich von Januar 1958 bis Dezember 1961 die Oberrealschule Memmingen und anschließend das Holbeingymnasium Augsburg, wo ich im Juli 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Von Oktober 1968 bis September 1970 leistete ich meine Wehrpflicht bei der Bundeswehr ab.

Das Studium der Zahnmedizin begann ich im Wintersemester 1970 an der Universität München. Nach zwei Semestern legte ich im Sommersemester 1971 die naturwiss. Vorprüfung und im Wintersemester 1973 die zahnärztliche Vorprüfung ab.

Im Sommer 1976 beendete ich nach sechs klinischen Semestern mein Studium mit dem Staatsexamen.

Seit September 1976 bin ich als Sanitätsoffizier und Zahnarzt bei der Bundeswehr.

